Aus der Abteilung für Transfusionswesen
(Vorsteher: Privatdozent Dr. med. Werther Schneider)
der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
(Direktor: Professor Dr. med. Leo Koslowski)

Leistungssteigerung und Spezifitätsgrenze des Enzymkreuztestes in der Erkennung blutgruppenspezifischer Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Barbara Stiefel
aus Schwäbisch Hall

1970

Aus der Abteilung für Transfusionswesen
(Vorsteher: Privatdozent Dr. med. Werther Schneider)
der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
(Direktor: Professor Dr. med. Leo Koslowski)

Leistungssteigerung und Spezifitätsgrenze des Enzymkreuztestes in der Erkennung blutgruppenspezifischer Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Barbara Stiefel
aus Schwäbisch Hall

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. Dr. phil. Klaus Mayer

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Werther Schneider
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Leo Koslowski

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung S. 1

A. Technik mit unveränderten Blutkörperchen S. 3

B. Technik mit oberflächenveränderten Blutkörperchen S. 3

a) Hochproteintest S. 3

b) Enzymtest S. 4

1. Trypsintest S. 4
2. Papaintest S. 5
3. Ficintest S. 6
4. Bromelintest S. 7

Zur Frage des Wirkungsmechanismus der Enzyme S. 10

Fragestellung S. 11

II. Hauptteil S. 13

A. Methodik S. 13

Technik der Hochprotein-Slide-Kreuzprobe und ihre Modifikation nach W. Schneider S. 16

Technik der Enzym-Slide-Kreuzprobe S. 17

B. Untersuchungen und Ergebnisse S. 19

I. Vergleichende Untersuchungen mit dem Hochprotein-Slide-Test und dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test S. 19

II. Vergleichende Untersuchungen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem modifizierten Enzym-Slide-Test unter Verwendung von Papain S. 20

III. Vergleichende Untersuchungen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem modifizierten Enzym-Slide-Test unter Verwendung von Ficin S. 24

IV. Vergleichende Untersuchungen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem modifizierten Enzym-Slide-Test unter Verwendung von Bromelin S. 28

V. Durchführung von 300 Einzelkreuzproben mit dem Papain-, Ficin- und Bromelinverfahren S. 39

III. Zusammenfassung und Diskussion S. 42

Tabellen S. 48

Literaturverzeichnis S. 64

I. Einleitung

Die Bluttransfusion ist auf fast allen Gebieten der Medizin zu einem festen Begriff innerhalb der Therapie geworden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei vielfach angewandter Transfusion eine Immunantikörperbildung u. U. angeregt und dadurch die Gefahr eines Zwischenfalles erhöht wird. Auf Grund dieser Tatsache wird als "wichtigste Sicherungsmaßnahme vor der Bluttransfusion"[9] im serologischen Labor die Kreuzprobe durchgeführt. Sie stellt eine Kreuzreaktion zwischen Empfängerserum und Spenderblutkörperchen (Maiortest) einerseits oder Spenderserum und Empfängerblutkörperchen (Minortest) andererseits dar. Da fast ausschließlich Antikörper im Empfängerserum zu Unverträglichkeitsreaktionen führen und die Spender auf irreguläre Antikörper untersucht werden, kommt meist nur der Maiortest zur praktischen Anwendung. Dabei wird angestrebt, möglichst alle Arten von Antikörpern, auch in schwächster Konzentration, zu erfassen. Eine große Zahl täglich anfallender Kreuzproben erfordert darüber hinaus, daß der Test einfach und rasch durchgeführt werden kann und einwandfreie Ablesbarkeit gewährleistet ist.

Seit der Entdeckung des Rhesus-Systems durch LANDSTEINER und WIENER[21] im Jahre 1940 lassen sich zwei Grundtypen von Blutgruppen-Antikörpern unterscheiden: 1. die Isoantikörper (= komplette Antikörper), die hauptsächlich im ABO-System natürlicherweise (= regulär) vorkommen; 2. die Immunantikörper (= inkomplette Antikörper), die häufig dem Rh-System angehören und erst als Folge sensibilisierender Ereignisse (= irregulär) wie Rh-Gruppenungleiche Transfusionen oder Schwangerschaften entstehen. Beide Arten können klinisch schwere Symptome hervorrufen, wenn sie im Organismus des Empfängers auf einen spezifischen Rezeptor stoßen, wie etwa beim m.haemolyticus neonatorum. Während die großmolekularen Isoantikörper am besten in Kochsalzmilieu und bei Zimmertemperatur zur sichtbaren Agglutination führen, reagieren die kleinermolekularen Immunantikörper erst durch Zugabe von Kon-

glutininlösungen wie Rinderalbumin, Dextran u. a. und bei Körpertemperatur. Beide Antikörpertypen haben die Eigenschaft, bivalent zu sein, d. h. mindestens zwei "Reaktionsorte" zu besitzen[45) 33) 35)]. Damit können sich die Antikörper an die ihnen entsprechenden Antigenrezeptoren der Erythrozytenoberfläche anlagern. Dieser Vorgang wird als Sensibilisierung bezeichnet und stellt die erste Stufe der Antigen-Antikörper-Reaktion dar. Anschließend kommt es zur sichtbaren Zusammenballung der Erythrozyten (2. Stufe der Antigen-Antikörper-Reaktion), die jedoch bei den inkompletten Antikörpern in Kochsalzmilieu meist ausbleibt.

Das serologisch unterschiedliche Verhalten der beiden Antikörperarten roten Blutkörperchen gegenüber läßt sich aufgrund folgender Gegebenheiten erklären: 1. Im Gegensatz zu den kompletten Antikörpern, die sich mit ihren beiden Valenzen an die entsprechenden Antigenrezeptoren zweier beieinanderliegender Erythrozyten anheften können und damit zu einer netzartigen Verknüpfung der roten Blutkörperchen (= sichtbare Agglutination) führen, vermögen die inkompletten Antikörper den Abstand nicht zu überbrücken; eine Haftstelle des Agglutinins bleibt unbesetzt. 2. Die Erythrozytenoberfläche ist ein Relief mit Erhebungen und Vertiefungen. Zahlreiche Beobachtungen haben mit ziemlicher Sicherheit ergeben, daß sich die Antigenrezeptoren mehr in den Krypten als auf den Erhebungen befinden. Auch dadurch wären die Antigene für die Valenzen der inkompletten Antikörper noch weniger oder überhaupt nicht erreichbar.

Aus diesen Feststellungen geht hervor, daß der Nachweis der kompletten Antikörper relativ einfach herbeizuführen ist. Die Sichtbarmachung der inkompletten Antikörper dagegen war schon mehrfach Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die wichtigsten Nachweismethoden, die sich daraus ergeben haben, sollen hier kurz zur Darstellung kommen. Dabei wird der Schwerpunkt auf die Enzymmethoden gelegt.

A. Technik mit unveränderten Blutkörperchen

a) Blocking-Test

Der von WIENER[50] 1944 beschriebene Test war für viele Arbeiten richtungsweisend. Er basiert auf der Überlegung, daß Erythrozyten, deren Antigenrezeptoren bereits von entsprechenden inkompletten Agglutininen besetzt (= blockiert) sind, nach Zugabe eines Serums mit korrespondierenden kompletten Antikörpern nicht agglutinieren können. Dieser Test findet heute kaum noch praktische Anwendung.

b) Anti-Human-γ-Globulin-Test

Zwei Jahre später wurde dieser Test durch COOMBS, MOURANT und RACE[7] eingeführt. Gibt man Anti-Human-γ-Globulin-Serum von immunisierten Kaninchen zu Erythrozyten, die mit Antikörpern beladen sind, kommt es zur Reaktion mit dem Antikörper-Globulin. Dabei werden die Erythrozyten in die Reaktion einbezogen (indirekte Agglutination). Dieses empfindliche Verfahren erfordert zwar einen großen Zeit- und Arbeitsaufwand, ist aber für den sicheren Nachweis fast sämtlicher inkompletter Antikörper hervorragend geeignet.

B. Technik mit oberflächenveränderten Blutkörperchen

a) Hochprotein-Test

Die sichtbare Agglutination der roten Blutkörperchen durch inkomplette Agglutinine wird bei dieser Methode durch Zusatz hochmolekularer Substanzen ("Supplemente") herbeigeführt. Als Supplement hat sich das von DIAMOND und DENTON[10] beschriebene Rinderalbumin (20 - 30 %) besonders bewährt. Eine mögliche Erklärung für die Supplementwirkungsweise gibt u. a. die Theorie von SPIELMANN[43]. Sie geht davon aus, daß die oberflächenaktive Lipoproteidmembran, die den Erythrozyten umgibt, als Träger elektronegativer Ladungen anzusehen ist. Unter dem Einfluß von Supplement kommt es zu La-

dungsveränderungen. Diese bewirken, daß die Erythrozytenhüllmembran gedehnt wird und tiefer gelegene Antigenrezeptoren an die Oberfläche drücken.

Die Vorteile dieses Tests gegenüber den beiden zuvor genannten Verfahren sind: 1. Vereinfachung und zeitliche Verkürzung des Arbeitsvorganges durch direkte Agglutination der Erythrozyten; 2. Möglichkeit der Erfassung von kompletten und inkompletten Antikörpern. Der Hochprotein-Slide-Test hat sich für den Routinegebrauch als durchaus geeignet erwiesen.

b) Enzymtest

Im Jahre 1928 erkannte FRIEDENREICH[12] die fermentative Wirksamkeit von Choleravibrionenfiltraten auf die Erythrozytenoberfläche. 1946 beobachtete PICKLES[30], daß Blutkörperchen, die mit diesem Enzym behandelt worden waren, nach Zugabe eines inkompletten Antikörper-Serums agglutinierten. Dabei handelt es sich um die Neuraminidase, die auch Myxoviren[2], besonders der Influenzagruppe, und eine Reihe anderer Bakterien besitzen. Auf der Suche nach weiteren Fermenten wurden als wirksamste Trypsin (tierischen Ursprungs), Papain, Ficin und Bromelin (pflanzlichen Ursprungs) entdeckt.

1. Trypsintest

Der Test wurde zuerst von MORTON und PICKLES[27] 1947 beschrieben und ergab sowohl mit Isoantikörpern als auch Immunantikörpern (besonders Anti-D) eine verstärkte Agglutination. Der Reaktionsablauf erfolgt in zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Phasen: 1. fermentative Präparation der Erythrozyten, d. h. Inkubation mit verdünnter Trypsinlösung (unspezifischer Teil der Reaktion); 2. eigentliche Kreuzprobe zwischen den "trypsinierten" Erythrozyten und dem Test-Serum (spezifischer Teil der Reaktion). Infolge der Umständlichkeit des Verfahrens hat sich der Test in der Praxis nicht sehr bewährt.

2. Papaintest

Papain wird aus dem Melonenbaum Carica papaya gewonnen. Es stellt ein Gemisch aus Papain, Chymopapain und dem offenbar unwirksamen[39] Papaya-Lysozym dar. Dem von KUHNS und BAILEY[20] 1950 eingeführten Test lag noch das zweiphasige Reaktionsprinzip des Trypsintests zugrunde: Papainbehandlung der Erythrozyten mit anschließender Inkubation des Serum-Erythrozyten-Gemisches. Damit wurden im Bereich des Rh-Systems[28] 14) wie auch zum Nachweis extrem schwacher A-Rezeptoren[42] empfindliche Ergebnisse erzielt. Im Gegensatz dazu ergaben von SPEISER und Mitarb.[41] durchgeführte Titerbestimmungen mit Anti-Rh-Seren, daß der Albumintest den Papaintest an Empfindlichkeit übertrifft. Durch die Einführung eines Papainaktivators - Cysteinhydrochlorid - von STRATTON 1953[44] konnte die Methode verbessert werden. Wesentlich vereinfacht wurde die Technik 1955 durch LÖW[23], indem er ohne Vorbehandlung gleichzeitig Erythrozytensuspension, aktivierte Papainlösung und Testserum aufeinander einwirken ließ. HEKKER und Mitarb.[16] übertrugen die Löw'sche Papain-Röhrchenmethode mit Erfolg auf Objektträger. Parallelbestimmungen mit dem Albumintest ergaben im Bereich des Rh-Systems drei- bis sechsfach höhere Titer zugunsten des Papain-Objektträgertestes.

Der direkte Papaintest nach LÖW erwies sich insbesondere in der Rh-Antikörper-Diagnostik als empfindliche und einfach durchzuführende Methode. Andere Blutgruppensysteme wie Duffy,M,N und S,s werden schlecht oder gar nicht erfaßt[17) 36) 11]. Weiterhin wirkt sich nachteilig aus, daß die aktivierte Papainlösung bei Temperaturen von 4° C einen raschen Aktivitätsabfall zeigt und nur in gefrorenem Zustand (-20° C) haltbar ist.

3. Ficintest

Der Ficintest ist seit der Veröffentlichung von WIENER und KATZ[51] 1951 und durch die 1957 durchgeführten Untersuchungen von HABER und ROSENFIELD[15] bekannt geworden. Er hat im Gegensatz zum Papain- und Bromelinverfahren noch wenig Eingang in das serologische Labor gefunden. Dies dürfte hauptsächlich darauf zurückzuführen sein, daß Ficin für die menschlichen Schleimhäute einen gefährlichen Reizstoff darstellt. Das Enzym findet sich in den Fruchtständen (Fruchtmilch) des Ficus-Baumes und setzt sich nach Analysen SGARBIERIS und Mitarb.[40] aus zehn Proteasen zusammen, an deren Reindarstellung noch gearbeitet wird[19]. Das von WIENER und KATZ ausgearbeitete Verfahren beruht wieder auf dem Prinzip der fermentativen Präparation der Erythrozyten. Die Einwirkungszeit des Ficins auf die dreimal gewaschenen Blutkörperchen - bei 37° C - beträgt eine Stunde. Daran schließt sich die Elimination des Enzyms und die Inkubation der Erythrozyten mit dem Testserum für weitere 60 Minuten an. Bis zur Ablesung des Resultats wird somit ein Zeitraum von mehr als zwei Stunden beansprucht.

MAKINODAN und MACRIS[26] erarbeiteten optimale Versuchsbedingungen für das o. a. Verfahren. Sie fanden innerhalb eines pH-Bereichs von 4,7 - 7,8 (höchste Titer bei pH ca. 6,8), bei einer Konzentration von 1,5 mg Ficin/ml Erythrozytenkonzentrat Inkubationszeiten von 10 bzw. 30 Minuten im Bereich des Rh- bzw. ABO-Systems für die Reaktion ausreichend. Damit wurden ca. 1 - 2 Stufen höhere Titer als mit dem Trypsin- und Papaintest erreicht. Durch einen Aktivator wurde Ficin nicht signifikant beeinflußt.

GILES[13] hält den Ficintest auch zum Nachweis von Anti-Le, Anti-P und Anti-A besonders geeignet. Andere Systeme wie M N s und Duffy werden zerstört. Ein be-

merkenswerter Vorzug des Ficin besteht darin, daß es als unverdünnte Lösung, zwischen 2° und 10° aufbewahrt, mindestens 1 Jahr stabil ist.

4. Bromelintest

Bromelin wurde bereits 1894 von CHITTENDEN[5] aus dem Saft der Ananasfrucht (Gattung "Bromeliaceae") gewonnen. Die Herstellung des Enzyms beschrieben Vetter und Schäffner 1961[48]. Agargel- und immunelektrophoretische Untersuchungen[3) 4)] gliederten Bromelin in 6 Proteine, von denen mindestens 2 proteolytische Aktivität besitzen. Mit der Reinigung und Darstellung des Bromelins aus dem Ananasstengel befaßten sich u. a. MURACHI und Mitarb.[29]. Dabei entdeckten sie im Gegensatz zu Papain und Ficin eine Kohlenhydratkomponente (2 %) und stellten aufgrund dieser Tatsache eine Glykoproteinstruktur des Bromelins zur Diskussion.

Erstmals erwähnt wurde der Bromelintest von WHEELER und Mitarb.[49] 1950 und LEWIS[22] 1957. Größere Bedeutung erlangte er erst durch Arbeiten von PIROFSKY[31] und PIROFSKY und MANGUM[34] in der hier beschriebenen Röhrchenmethode. Sie gleicht der Löw'schen Papainmethode, da die Erythrozytenvorbehandlung entfällt. Außerdem ist es möglich, unbehandelte, isotonische Bromelinlösungen zu verwenden. Als brauchbar erwies sich eine 0,5 %ige, auf pH 5,5 eingestellte Bromelinlösung, die nicht zusätzlich aktiviert werden muß. Ihre Haltbarkeit kann durch Zusatz von 0,1 % Natriumazid von einem auf mindestens zwei Monate erhöht werden. Das Reaktionsprinzip stellt sich folgendermaßen dar: Erythrozytensuspension, Testserum und Bromelinlösung werden zu gleichen Teilen in Röhrchen gemischt und inkubiert. Der sich anschließenden Zentrifugierung folgt die makroskopische Ablesung. Die optimale Reaktionstemperatur beträgt 37° C, die Reaktionszeit 15 Minuten. Mit diesem Verfahren übertraf Pirofsky beim Nachweis eines Anti-D den Coombstest um 2 und den Papain-Cystein-Test um 1 Titerstufe.

1960 entdeckte PIROFSKY[32] die Wirkung eines Plasmafaktors, der die Bromelin-Antigen-Antikörperreaktion potenzierte. Dieser Faktor ist nur in frischem Plasma oder AB-Serum enthalten. Auch VETTER und SCHÄFFNER[47] führen die hohen Titerwerte, die sie u. a. beim Nachweis von Kell-, Duffy, MNS- und P-Antikörpern erhielten, darauf zurück. Demgegenüber vertritt CLAFLIN[6] die Ansicht, daß der Bromelintest zur Erfassung niedertitriger Antikörper gegen Kell-, Kidd- und Duffy-Antigene nicht ausreiche. 1964 veröffentlichte Arbeiten[24,25] diskutieren das gelegentliche Auftreten des Prozonenphänomens im Pirofsky-Test. Sie halten auch die Bromelin-Objektträgermethode für den Antikörpernachweis geeignet.

Obwohl die Testergebnisse der verschiedenen Autoren z. T. wesentlich differieren und die Ansichten über die einzelnen Techniken auseinandergehen, hat die Bedeutung des Enzymtests in den letzten Jahren zugenommen. Dies ist wohl in erster Linie auf die weitere Vereinfachung der Methoden zurückzuführen. Insbesondere hat sich der Test zum Nachweis inkompletter Rh-Antikörper durchgesetzt. Die Mehrzahl der Autoren ist sich jedoch darüber einig, daß bewährte Testmethoden wie Albumin- oder Coombstest durch das Enzymverfahren nicht ersetzt werden können. Ein tabellarischer Vergleich zwischen Papain, Ficin und Bromelin gibt einen entsprechenden Überblick:

	Papain	Ficin	Bromelin
Molekulargewicht	21 000	26 000	33 000
Isoelektrischer Punkt	8,75	9,0	9,55
Chemische Zuordnung	Protein	Protein	Glykoproteid?
Bisher durchgeführte Testarten	indirekt. Test (R) direkt. Test (R,O)	indirekt. Test (R)	indirekt. Test (R) direkt. Test (R,O)
Optimale Enzymkonzentration	0,5 - 1 % (23)	1,5 mg/ml Erythrozytenkonzentr. (26)	0,5 - 1 % (34)
Optimale pH-Einstellung	5,4 (23)	4,7 - 7,8 (26)	5,5 (34)
Stabilität der Gebrauchslösung	5-10°C: 1 Woche -20°C: 6 Monate	5-10° C: 1 Jahr	5-10° C: 1 Woche (bis 3 Monate)
Empfindlichster Nachweis	Rh	Rh, (A,P, Lewis)	Rh,(P)
Schlecht oder nicht nachweisbar	Duffy, M,N,S,s	Duffy,M,N,S,s	unterschiedliche Angaben

R = Röhrchentest
O = Objektträgertest

Zur Frage des Wirkungsmechanismus der Enzyme

Zur Klärung dieser Frage existiert eine Reihe bisher unzureichend gesicherter Theorien. Im folgenden wird versucht, ein Bild der gegenwärtigen Vorstellungen zu geben, ohne auf Einzelheiten einzugehen.

1. Die Struktur der Erythrozytenoberfläche

Die Antigen-Antikörper-Reaktion spielt sich zwischen den Antigenen der Zelloberfläche und den gegen sie gerichteten, spezifischen Antikörpern ab. Daher kommt der Aufklärung der erythrozytären Oberflächenstruktur eine entscheidende Bedeutung zu. Nach derzeitigen Auffassungen ist die Erythrozytenmembran als mehrschichtige Hülle anzusehen. PROKOP und UHLENBRUCK[35] sprechen von einer Zweischichtenstruktur menschlicher Blutkörperchen. Die äußerste Oberflächenschicht ist wahrscheinlich so aufgebaut, daß einer inneren Lipoidmembran nach außen Mucoide und Glykoproteine in der Weise aufgelagert sind, daß Zwischenräume entstehen, in denen die Lipoidmembran noch freiliegt. Die Blutgruppenantigensysteme sind chemisch den Lipoiden und Mucoiden zuzuordnen. Die serologisch faßbare, d. h. determinante Gruppe fast aller Antigene besteht mit großer Wahrscheinlichkeit aus Kohlenhydratbausteinen (wie die durch Neuraminidase abstaltbare Neuraminsäure). Nur mit Hilfe dieser Gruppe ist es möglich, Schlüsse auf die räumliche Anordnung der Antigene zu ziehen.

2. Die Veränderung der Erythrozytenoberfläche durch Enzymeinwirkung

Nach UHLENBRUCK und KIM[46] muß zwischen den Wirkungen zweier Enzymsysteme unterschieden werden: a) Glykosidasen (z. B. Neuraminidase) setzen die echten Kryptantigene (Friedenreich-Antigene) frei. Dazu gehören auch

Antigene wie M und N. b) Proteasen (z. B. Trypsin, Papain) wirken auf die Erythrozytenoberfläche ein, indem sie neuraminsäurehaltige Mucopeptide abspalten. Durch die Beseitigung dieses räumlichen Hindernisses werden die tiefliegenden Pseudokryptantigene (u. a. Rh-Antigene) für die Valenzen der kleinmolekularen inkompletten Antikörper faßbar. Nach SEAMAN und UHLENBRUCK[38] führt die Abspaltung der Mucopeptide zu einer meßbaren Verminderung der elektrischen Oberflächenladung. Neue Untersuchungen auf diesem Gebiet[18] kommen zu dem Ergebnis, daß der Hydratmantel der Zelloberfläche das entscheidende Hindernis für die Agglutination bilde. Durch enzymatische Abspaltung wasserbindender Gruppen (Neuraminsäure, Mukoide) wird die Hydrathülle reduziert. Zusätzlich agglutinationsfördernd wirkt die damit verbundene, erhöhte intrazelluläre Kohäsionsneigung. Auch die Kolloidnatur der Fermente in ihrer Wirkung als Supplement wird diskutiert[28].

Fragestellung

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, zu untersuchen, ob der Enzymtest mit gebrauchsfertigen Handelspräparaten ein empfindliches und zugleich zuverlässiges Antikörpernachweisverfahren darstellt, das als weitere Kreuzmethode in den Routinebetrieb einer Blutzentrale eingeführt werden kann. Zu diesem Zweck werden vergleichende Titerbestimmungen im Bereich des Rh-Systems zwischen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (HPSST nach Schneider) und dem Enzymverfahren durchgeführt. Der Enzymtest kommt in verschiedenen Modifikationen zur Anwendung. Dadurch läßt sich die in Bezug auf Empfindlichkeit und Spezifität der Ergebnisse leistungsfähigste Methode ermitteln.

Bei der kurzzeitigen Verwendung von Enzymen in der Kreuzprobe beobachtete das serologische Labor der Tübinger Blutzentrale häufig unspezifische Agglutinationen

bei eindeutig negativem Ausfall des HPSST und des Coombs-Tests. Daraus ist zu folgen, daß die Beurteilung solcher Präparate ohne Mitführung einer zuverlässigen Methode erheblich erschwert ist und zu falschen Diagnosen führen kann.

In der Literatur findet man da und dort die Erwähnung unspezifischer Reaktionsausfälle beim Enzymtest. WIENER und KATZ[51)] fielen in ihren Versuchsergebnissen einzelne Pseudoagglutinationsbildungen auf, die sie auf das Vorhandensein von Autoantikörpern oder andere sehr schwachtitrige inkomplette Antikörper zurückführten. Später erklärten sich andere Autoren[11) 14)] das Phänomen, insbesondere beim Papaintest, durch Abkühlung des Gemisches (unter 37° C) und darauffolgender Reaktion mit im Serum vorhandenen Kälteantikörpern. Nach anderer Ansicht[1)] ist allgemein die Labilität der Enzyme für unspezifische Reaktionsausfälle verantwortlich.

Neben der Prüfung des Enzymtests auf Empfindlichkeit im Nachweis eines Immun-Anti-D ist die Beachtung der eben erwähnten unspezifischen Agglutinationen in ihrer Auswirkung auf die Ablesbarkeit der Resultate eine weitere Aufgabe dieser Arbeit.

II. Hauptteil

A. Methodik

Alle Untersuchungen wurden mit einem Anti-D-haltigen Serum eines sensibilisierten Spenders durchgeführt. Damit wurde in den quantativen Leistungsvergleich eine konstante Bezugsgröße einbezogen.

Für die Titerbestimmungen muß aus antikörperhaltigem Serum eine geometrische Verdünnungsreihe mit antikörperfreiem AB-Serum bis zur Stufe 1 : 9192 angelegt werden. In 13 bereitgestellte Röhrchen werden jeweils 0,2 ml AB-Serum getropft. Anschließend pipettiert man 0,2 ml Serum ins 1. Röhrchen und vermischt gut. Diese erste Verdünnungsstufe entspricht einer 1 : 2-Verdünnung des Serums, der 0,2 ml entnommen, ins nächste Röhrchen pipettiert und vermischt wird. Das Ergebnis ist eine 1 : 4-Verdünnung. Dieser Vorgang wird bis zur 13. Stufe wiederholt, so daß man eine Verdünnung von 1 : 9192 erhält.

Die Verdünnung des Serums erhöht sich noch um rund eine Stufe, wenn zum Serumtropfen Rinderalbumin oder Enzym und Erythrozytensuspension hinzugefügt werden. Die Reihe beginnt also mit einer 1 : 2 Verdünnung. Das unverdünnte Serum und die einzelnen Verdünnungsstufen dienen sowohl zum Ansatz des HPSST als auch des Enzymtests.

Die Testerythrozyten mit den Merkmalen O/Rh-positiv wurden täglich anfallenden Blutproben entnommen.

Die Titerhöhe des Antikörperserums wurde makroskopisch wie mikroskopisch bestimmt. Unter dem makroskopischen Antikörper-Titer versteht man die Verdünnungsstufe des Serums, bei der mit bloßem Auge gerade noch Agglutinate sichtbar sind ("makrosk. positiv"). Als mikroskopischen Antikörper-Titer bezeichnet man die Stufe der ausschließlich mikro-

skopisch sichtbaren Agglutinate. Noch "mikrosk. positiv" gelten Agglutinate mit einer Beteiligung von 4 - 6 Erythrozyten.

Zur Durchführung des Hochprotein-Slide-Testes (HPST) werden auf einem Objektträger je 2 Verdünnungsstufen des Antikörperserums zur Reaktion gebracht. Um einen konstanten Ansatz zu erhalten, ist darauf zu achten, daß die Tropfengröße möglichst wenig differiert. Dies kann durch Verwendung gleicher (0,2 ml) und senkrecht gehaltener Pipetten erreicht werden. Zu einem Tropfen Serum werden je 1 Tropfen 20 %iges Rinderalbumin und 1 Tropfen einer frisch hergestellten, 2 %igen Erythrozytensuspension in AB-Serum hinzugefügt, vermischt und auf einer Fläche von 8 - 10 mm Durchmesser ausgebreitet. Die Objektträger mit den Reaktionsgemischen legt man in feuchte Kammern und stellt sie 30 Min. bei 37° C in den Brutschrank. Die Ablesung erfolgt unmittelbar nach der Inkubationszeit.

Die Modifikation des beschriebenen HPST nach W. SCHNEIDER[37] besteht darin, daß die Gemische während der Inkubationszeit auf einer Schaukelplatte dauernd in sanfter Bewegung gehalten werden. Diese Platte wird durch einen Elektromotor mit gleichbleibender Frequenz (20/min.) und einer Amplitudenhöhe von 2 cm hin- und herbewegt.

Für den Enzym-Slide-Test verwendeten wir Präparate von Papain, Ficin und Bromelin verschiedener Firmen. Sie werden entweder als gebrauchsfertige Lösungen oder in Form von Pulvern geliefert. Vor Gebrauch werden die pulverisierten Präparate in der angegebenen Menge eines bestimmten Lösungsmittels aufgelöst. Der Test wird, wie folgt, durchgeführt: 1 Tropfen Antikörperserum vermischt man mit je 1 Tropfen Enzymlösung und 1 Tropfen Erythrozytensuspension in NaCl physiol. Der Prozentgehalt an Erythrozyten wird von den einzelnen Firmen unterschiedlich angegeben. Er

schwankt zwischen 2 und 10 %. Die Objektträger mit den Reaktionsgemischen werden in feuchte Kammern gebracht und bei 37° C 30 Min inkubiert. Anschließend erfolgt die Ablesung. Die Modifikationen dieser Methode sollen innerhalb der ausführlichen Darstellung der Techniken und der einzelnen Versuchsreihen besprochen werden.

Die Beurteilungen der Testverfahren richtete sich einerseits nach dem makroskopisch und mikroskopisch festgestellten Antikörper-Titer, zum anderen nach der Häufigkeit und Stärke von mikroskopisch beobachteten, unspezifischen Agglutinationen. Dabei konnten drei Stärkegrade unterschieden werden. Der erste Grad (schwach) bezeichnet vorzugsweise am Rand des Tropfens auftretende kleinschollige (3 - 4 Erythrozyten) Agglutinate. Das Tropfenzentrum ist fast immer einwandfrei, wodurch die Beurteilung zur Diagnose "negativ" tendiert. Der zweite Grad (mittelstark) zeigt klein- bis mittelschollige Agglutinate, die nicht nur am Rand, sondern auch in Tropfenmitte zu finden sind. Sie erscheinen meist in einer oberflächlich schwimmenden Schicht, wobei in tieferen Schichten nicht agglutinierte Erythrozyten erkennbar sind. Die Beurteilung schwankt zwischen "negativ" und "positiv". Der dritte Grad (stark) läßt zahlreiche mittel- bis grobschollige Agglutinate in Tropfenrand und -mitte erkennen. Auch sie sind häufig an der Oberfläche schwimmend zu beobachten. Bei starker Vergrößerung erscheinen die agglutinierten Erythrozyten eigenartig verändert, was vermutlich auf eine gesteigerte Enzymeinwirkung zurückzuführen ist. Hier ist die Beurteilung schwierig und tendiert oft zur Diagnose "positiv".

Zusammenfassend folgt eine übersichtliche Darstellung der Techniken der Hochprotein-Slide- und Enzym-Slide-Kreuzprobe mit ihren Modifikationen.

Technik der Hochprotein-Slide-Kreuzprobe und ihre Modifikation nach W. SCHNEIDER

1. Objektträger mit Fettstift bezeichnen, links mit "E" (Empfänger), rechts mit "S" (Spender).
2. 2 Tropfen Empfängerserum nebeneinander auf den Objektträger tropfen.
3. Dazu jeweils 1 Tropfen einer 20 %igen Rinderalbuminlösung.
4. 1 Tropfen einer 2 %igen Aufschwemmung der Spendererythrozyten in AB-Serum in dem mit "S" bezeichneten Serum-Albumintropfen verrühren.
5. Wie unter 4. wird 1 Tropfen einer gleichprozentigen Empfängererythrozyten-Suspension in dem mit "E" bezeichneten Tropfen verrührt (Eigenkontrolle).
6. Objektträger 30 Min. bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubieren.
7. Ablesung erfolgt unter leichtem Schaukeln des Objektträgers, makroskopisch gegen einen weißen Hintergrund, mikroskopisch bei schwacher Vergrößerung.

Beurteilung:

1. Die Kreuzprobe ist negativ, wenn in dem mit "S" bezeichneten Tropfen keine Agglutination eintritt.
2. Die Kreuzprobe ist positiv, wenn in dem mit "S" bezeichneten Gemisch eine Agglutination eingetreten ist, die in dem mit "E" bezeichneten Tropfen nicht beobachtet wird.
3. Die Kreuzprobe ist unspezifisch positiv, wenn in Tropfen "S" feine Agglutinationen, die im Tropfen "E" in gleicher Stärke oder stärker vorhanden sind, beobachtet werden. Es handelt sich dabei um Pseudoagglutinationen oder Reaktionen, die durch Kälte- und Autoantikörper hervorgerufen wurden.

Wie aus Untersuchungen von W. SCHNEIDER und P. CORNILS[37) 8)] hervorgeht, kann die Empfindlichkeit

dieses Tests im Bereich des Rh-Systems um durchschnittlich zwei Titerstufen gesteigert werden, wenn das Reaktionsgemisch während der gesamten Inkubationszeit durch gleichmäßiges Schaukeln in Bewegung gehalten wird. Diese Modifikation wurde als Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (HPSST) bezeichnet.

Technik der Enzym-Slide-Kreuzprobe

1. Objektträger mit Fettstift bezeichnen, links mit "E" und rechts mit "S".
2. 2 Tropfen Empfängerserum nebeneinander auf den Objektträger tropfen.
3. Dazu jeweils 1 Tropfen Enzymlösung.
4. 1 Tropfen einer 2 - 10 %igen Aufschwemmung der Spendererythrozyten in NaCl in dem mit "S" bezeichneten Serum-Enzymtropfen verrühren.
5. Wie unter 4. wird ein Tropfen einer gleichprozentigen Aufschwemmung von Empfängererythrozyten in dem mit "E" bezeichneten Tropfen verrührt.
6. Objektträger in eine feuchte Kammer bringen und 30 Min. bei 37° C inkubieren.
7. Ablesung erfolgt unter leichtem Schaukeln des Objektträgers makroskopisch und mikroskopisch.

Beurteilung:

1. Die Kreuzprobe ist negativ, wenn in dem mit "S" und "E" bezeichneten Tropfen keine Agglutination eingetreten ist.
2. Die Kreuzprobe ist positiv, wenn in dem mit "S" bezeichneten Tropfen eine Agglutination beobachtet wird, die in dem mit "E" bezeichneten Tropfen entfällt.
3. Die Kreuzprobe ist unspezifisch positiv, wenn Agglutinationen sowohl im Tropfen "S" als auch im Tropfen "E" beobachtet werden.

Die beschriebene Technik wurde für die vorliegende Arbeit folgendermaßen modifiziert:

1. Ungeschaukelter Enzymtest
   Das Gemisch aus Serum, Enzymlösung und Erythrozytensuspension wird 15 - 20 Min. bei 20° C in einer feuchten Kammer inkubiert.

2. Geschaukelter Enzymtest
   a) Schaukeltest mit Suspension
      Das Gemisch aus Serum, Enzymlösung und Erythrozytensuspension wird während der gesamten Inkubationszeit (30 Min.) bei 37° C auf der Schaukel in Bewegung gehalten.
   b) Schaukeltest mit Sediment
      Statt der Suspension wird eine stecknadelkopfgroße Menge Erythrozytensediment verwendet.

3. Enzymtest mit Erythrozytenvorbehandlung (modifiziert nach Wiener - Katz und Haber - Rosenfield)
   a) Vorbehandlung der Erythrozyten
      1 Tropfen einer 6 - 8 %igen Suspension 1 mal gewaschener Erythrozyten in NaCl in ein Röhrchen geben.
      1 Tropfen Enzymlösung hinzufügen, mischen und 3 - 5 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend Röhrchen mit NaCl auffüllen, zentrifugieren, die überstehende Lösung abschütten und die Erythrozyten im verbleibenden Flüssigkeitsrest resuspendieren.
   b) Eigentlicher Test
      Er erfolgt in derselben Weise wie die bei 2. beschriebene Technik mit dem Unterschied, daß das Reaktionsgemisch aus nur 2 Tropfen, dem Empfängerserum und der Suspension vorbehandelter Spender- bzw. Empfängererythrozyten besteht.

B. Untersuchungen und Ergebnisse

I. Vergleichende Untersuchungen mit dem Hochprotein-Slide-Test (HPST) und dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (HPSST) nach W. SCHNEIDER

Mit dieser Versuchsreihe soll zunächst die von P. CORNILS[8] beobachtete Empfindlichkeitssteigerung des während der Inkubationszeit geschaukelten gegenüber dem einfachen HPST noch einmal demonstriert werden. Damit wird bewiesen, daß der HPSST für unseren Leistungsvergleich einen adäquaten Bezugstest darstellt.

Das Untersuchungsgut jeder Methode umfaßt 20 Kreuzserien, in denen das Anti-D-Serum desselben sensibilierten Spenders mit verschiedenen D-Erythrozyten aus täglich anfallenden Blutproben gekreuzt wird.

Die Untersuchungen werden folgendermaßen durchgeführt: Wie oben beschrieben stellen wir mit dem Anti-D-Serum eine geometrische Verdünnungsreihe bis zur 13. Stufe her. Von jeder Stufe wird eine Kreuzreaktion nach beiden Methoden angestellt. Zusätzlich führen wir bei jeder Serie eine negative Kontrolle mit Anti-D-freiem Serum des entsprechenden Rh-positiven Erythrozytenlieferanten mit. Alle Objektträger werden in feuchte Kammern gebracht und eine der Kreuzserien für 30 Min. bei 37° C in Ruhe belassen, die andere während der gleichen Zeit und bei gleicher Temperatur in ständiger Bewegung gehalten. Anschließend wird abgelesen.

Ergebnisse (Tab. 1):

Bei insgesamt 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten nach dem HPST und dem HPSST wies mikroskopisch 1 Versuch keinen Titerunterschied auf, 13 Versuche zeigten einen Titerunterschied von 1 Stufe, 4 Versuche einen Titerunterschied von 2 und zwei Versuche einen Titerunterschied von 3 Stufen zugunsten des HPSST (Tab. 11).

Die durchschnittlich erreichte Titerhöhe der ungeschaukelten Methode lag makroskopisch bei Titerstufe 5, entsprechend einer Verdünnung von 1 : 32, mikroskopisch bei Stufe 7, d. h. einer Verdünnung von 1 : 128. Die geschaukelte Methode erreichte makroskopisch Titerstufe 6 - 7, also eine Verdünnung von 1 : 64 bis 1 : 128, mikroskopisch Titerstufe 8 - 9, entsprechend einer Verdünnung von 1 : 256 bis 1 : 512. Die mitgeführten Kontrollen waren durchweg negativ.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß die Methode mit ständig geschaukeltem Reaktionsgemisch der üblichen Ausführung des Slide-Testes überlegen ist. Der HPSST reagiert mikroskopisch wie makroskopisch durchschnittlich 1 - 2 Stufen empfindlicher und zeigt damit Antikörper in 2 - 4fach höherer Verdünnung als im HPST an. Gelegentlich werden geringfügige Pseudoagglutinationen (Geldrollen) beobachtet, die die Ablesung nicht beeinträchtigen. Somit ergibt sich die Übereinstimmung mit den Ergebnissen von P. Cornils.

II. Vergleichende Untersuchungen mit dem HPSST und dem Enzym-Slide-Test (EST) in verschiedenen Modifikationen unter Verwendung von P a p a i n

In den folgenden Versuchsreihen wird ein Vergleich zwischen dem HPSST und dem Enzymverfahren in verschiedenen Ausführungen bezüglich ihrer Reaktionsempfindlichkeit- und spezifität vorgenommen.

Für die erste Untersuchungsreihe dieser Art wählten wir ein Papain-Präparat, das in Pulverform geliefert wird. Zum Gebrauch wird der Inhalt eines Fläschchens in 2 ml. aqua dest. aufgelöst und anschließend für 5 - 10 Min. bei 37° C aktiviert. Diese Lösung soll bei Raumtemperatur 2 Tage, im Kühlschrank mindestens 1 Woche und tiefgefroren mehr als 6 Monate haltbar sein. Hier sei bemerkt, daß gelöstes Papain

bei uns nie länger als 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt wurde, da der Inhalt eines Fläschchens nur für knapp 4 Serien ausreichte.

Das Untersuchungsgut dieser Reihe umfaßte je Methode 20, insgesamt 80 Kreuzserien zwischen Anti-D-Serum und D-Erythrozyten aus dem Spendergut der Blutzentrale. Folgende Methoden kamen zur Ausführung:

A HPSST

B EST: ungeschaukelter Test mit Erythrozytensuspension

C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension

D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment

Für alle Kreuzserien stellen wir eine 13-stufige, geometrische Verdünnungsreihe des Anti-D-Serums mit AB-Serum her. Der HPSST wird, wie oben beschrieben, durchgeführt. Für die Enzymverfahren verwenden wir in der unter B und C angeführten Methode eine 5 - 10 %ige Erythrozytenaufschwemmung in NaCl. In Methode D wird statt der Suspension eine stecknadelkopfgroße Menge Erythrozyten-Sediment dem Reaktionsgemisch beigefügt. Innerhalb jeder Kreuzserie läuft eine negative Kontrolle mit Anti-D-freiem Serum mit. Alle Serien werden 30 Min. bei 37° C inkubiert. Die Gemische der Verfahren C und D befinden sich auf einer Schaukel in dauernder Bewegung. Der ungeschaukelte Test (B) wird von der Herstellerfirma empfohlen. Die Ablesung erfolgt bei allen Methoden makroskopisch und mikroskopisch.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerstufen (Tab. 2):

Zunächst werden die mikroskopischen Titerunterschiede zwischen dem HPSST und den verschiedenen Enzymtestmodifikationen, anschließend die von den einzelnen Methoden durchschnittlich erreichten Titerhöhen angegeben.

Der Vergleich zwischen HPSST und dem ungeschaukelten Papaintest mit Suspension (B) erbrachte bei 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten folgende Ergebnisse: 7 Versuche wiesen keinen Titerunterschied auf, 6 Versuche einen Unterschied von 1 Stufe und 4 Versuche einen solchen von 2 Stufen zugunsten des HPSST. 3 Versuche zeigten einen Titerunterschied von 1 Stufe zugunsten Methode B.

Der Vergleich zwischen HPSST und dem Papainschaukeltest mit Suspension (C) ergab bei 20 Versuchen in 5 Fällen keinen Titerunterschied, in 8 Fällen einen solchen von 1 Stufe, in 3 Versuchen von 2 und in 4 Versuchen von 3 Stufen zugunsten Methode C.

Der Vergleich zwischen HPSST und dem Papainschaukeltest mit Sediment (D) erbrachte bei 20 Versuchen in 2 Fällen keinen Titerunterschied, in 5 Versuchen einen Unterschied von 1 Stufe, in 9 Versuchen einen solchen von 2, in 3 Versuchen von 3 und in 1 Fall von 4 Stufen zugunsten Methode D (Tab. 12).

Beim HPSST lagen die durchschnittlich erreichten Titerhöhen makroskopisch bei Titerstufe 6 - 7, entsprechend einer Verdünnung von 1 : 64 bis 1 : 128, mikroskopisch bei Stufe 8 - 9, d. h. Verdünnung 1 : 256 bis 1 : 512.

Unter den verschiedenen Papaintestmethoden lagen die durchschnittlich erreichten Titerhöhen für Methode B makroskopisch bei Titerstufe 6, also einer Verdünnung von 1 : 64, mikroskopisch bei Stufe 8, einer Verdünnung von 1 : 256.

Methode C erreichte Makroskopisch Titerstufe 8 oder Verdünnungsstufe 1 : 256, mikroskopisch Stufe 10 oder Verdünnung 1 : 1024. Methode D erzielte makroskopisch Titerstufe 8 - 9, d. h. eine Verdünnung von 1 : 256 bis 1 : 512, mikroskopisch Stufe 10 - 11 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 1024 bis 1 : 2048 (Tab. 18).

Die Ergebnisse zeigen die quantitative Überlegenheit der Methode D. Sie reagiert makroskopisch wie mikroskopisch durchschnittlich 1 - 2 Stufen empfindlicher als Methode C, 2 Stufen empfindlicher als Methode A und 2 - 3 Stufen empfindlicher als Methode B. Bei richtiger Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß in Methode A, B und C eine zusätzliche Verdünnung des Ausgangsserums durch Zugabe von Erythrozytensuspension auftritt, die bei D unter Verwendung von Erythrozytensediment vermieden wird. Schon dadurch können höhere Titer erreicht werden, die im Durchschnitt mindestens 1/2 Stufe betragen. Dies gilt für alle folgenden Versuchsreihen.

b) Spezifität:

Während die Resultate des HPSST bis auf einige mit geringfügiger Geldrollenbildung einwandfrei, d. h. makroskopisch und mikroskopisch gut ablesbar waren, beobachteten wir bei allen Papainmethoden eine mikroskopisch sichtbare, unterschiedlich stark ausgeprägte Tendenz zu unspezifisch positiven Ausfällen. Die makroskopischen Titerendpunkte dagegen waren bei allen Versuchen deutlich zu erkennen.

Störende Agglutinationen fanden sich in erster Linie innerhalb Methode D. Von 20 Kreuzserien (300 Reaktionsgemische) zeigten 19 Präparate "schwache" (1. Grad), 9 "mittelstarke" (2. Grad) und 3 "starke" (3. Grad) unspezifisch-positive Reaktionen. 1 Versuch war einwandfrei.

Bei Methode C wiesen 20 Präparate "schwache", 7 "mittelstarke" und 1 Fall "starke" Agglutinationen auf. 2 Versuche waren ohne Beanstandung.

Bessere Ergebnisse erbrachte Methode B. Hier wiesen 14 Präparate "schwache" Agglutinationen auf. 10 Versuche waren einwandfrei.

Auffallend bei der Verteilung der erwähnten Präparate in den einzelnen Titerreihen war einmal vermehrtes Auftreten von unspezifischen Agglutinationen in Gemischen, die in 2 - 3 Stufen höherer Verdünnung als die mikroskopisch erreichten Titerhöhen vorlagen, zum anderen mehrmaliges Vorkommen in den negativen Kontrollen. Diese Agglutinate waren - in einer oberflächlichen Schicht schwimmend - teilweise makroskopisch sichtbar.

Besonders stark und häufig fanden sich unspezifisch-positive Reaktionen bei den quantitativ empfindlichsten Methoden D und C, was ihren Wert herabsetzt. Der HPSST zeigte im Vergleich zur Methode D einen Leistungsabfall von makroskopisch und mikroskopisch zwei Stufen. Bezüglich der Ablesbarkeit der Reaktionsergebnisse übertrifft er dagegen mit durchweg einwandfreien Einzelresultaten die übrigen Methoden.

III. Vergleichende Untersuchungen mit dem HPSST und dem Enzym-Slide-Test in verschiedenen Modifikationen unter Verwendung von F i c i n

Für die folgenden Versuche kam ein Präparat der Pflanzenprotease Ficin zur Anwendung, das als gebrauchsfertige Lösung in Fläschchen zu je 10 ml geliefert wird. Diese enthält außerdem 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei Aufbewahrung zwischen 2° und 10° C soll die unverdünnte Lösung mindestens 1 Jahr stabil sein. In unseren Versuchen kam nur frische, unverdünnte Ficinlösung zur Anwendung.

Das Untersuchungsgut dieser Reihe bestand aus je 20, insgesamt 80 Kreuzserien, zwischen Anti-D-Serum und ausgewählten D-Spendererythrozyten. Folgende Methoden kamen zur Durchführung:

A HPSST

E EST: Test mit Erythrozytenvorbehandlung, modifiziert nach WIENER-KATZ und HABER-ROSENFIELD

C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension

D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment

Zum Ansatz der genannten Methoden dient wieder eine 13-stufige geometrische Verdünnungsreihe des Anti-D-Serums. Der HPSST wird wie üblich durchgeführt. Die von der Firma empfohlene Methode E stellt ein indirektes Testverfahren dar, da die Erythrozyten zunächst fermentativ präpariert werden: 1 Tropfen einer 6 - 8 %igen Suspension 1 mal gewaschener Blutkörperchen in NaCl wird mit der gleichen Menge einer Ficinlösung im Reagenzglas vermischt und für 3 - 5 Min. bei Raumtemperatur abgestellt. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschvorgang mit NaCl. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen (Entfernung des Ficins) und die Erythrozyten im verbleibenden Flüssigkeitsrest resuspendiert, so daß eine ca. 6 - 8 %ige Suspension entsteht. Nunmehr erfolgt die eigentliche Kreuzprobe: auf den Objektträgern stellt man Gemische, bestehend aus je 1 Tropfen Serum der entsprechenden Verdünnungsstufen und 1 Tropfen der vorbereiteten Erythrozytensuspension, her. Methode C führen wir mit 6 - 8 %iger Blutkörperchensuspension in NaCl, Methode D mit Erythrozytensediment durch. Die Reaktionsgemische aller Kreuzserien werden 30 Min. bei 37° C geschaukelt. Daran schließt sich die makroskopische und mikroskopische Ablesung an.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerhöhen (Tab. 3):

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode E in 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten wiesen 2 Versuche keinen Titerunterschied, 6 Versuche einen Unterschied von 1 Stufe, 7 Versuche einen solchen von 2, 2 Versuche einen von 3 und 1 Versuch von 4 Stufen zugunsten Methode E auf. 2 Versuche zeigten einen Titerunterschied von 1 Stufe zugunsten der Methode A.

Der Vergleich zwischen HPSST und Methode C ergab bei 20 Versuchen in 7 Fällen keinen Titerunterschied. 3 Versuche zeigten einen Unterschied von 1 Stufe zugunsten der Methode C. 4 Fälle wiesen einen Unterschied von

1 Stufe, je 2 Versuche einen solchen von 2, 3 bzw. 4 Stufen zugunsten der Methode A.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode D in 20 Versuchen zeigten 4 Versuche keinen Titerunterschied, 8 Versuche einen solchen von 1 Stufe und 1 Versuch von 2 Stufen zugunsten der Methode D. In 1 Fall ergab sich ein Unterschied von 1 Stufe, in 3 Versuchen ein solcher von 2 und jeweils 1 Versuch einer von 3, 4 und 5 Stufen zugunsten der Methode A (Tab. 13).

Bei der Betrachtung der Einzelergebnisse fällt bei allen Ficinverfahren, insbesondere bei den Methoden C und D, eine beträchtliche Streuung der Werte auf.So bewegen sich die mikroskopischen Titerendpunkte der Methode D in einem Bereich, der 6 aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen umfaßt. Im Vergleich dazu ist die Methode A hervorzuheben, deren Einzelwerte sich nur innerhalb eines 3 Stufen umfassenden Bereichs bewegen.

Die von Methode A im Durchschnitt erreichten Titerhöhen lagen makroskopisch bei Titerstufe 6, gleich Verdünnung 1 : 64, mikroskopisch bei Titerstufe 8, d. h. Verdünnung 1 : 256.

Unter den Ficintestmethoden lagen die durchschnittlich erreichten Titerhöhen für Methode E makroskopisch bei Stufe 7 - 8 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 128 bis 1 : 256, mikroskopisch bei Stufe 9 - 10, also einer Verdünnung von 1 : 512 bis 1 : 1024.

Methode C erreichte makroskopisch Stufe 5 oder Verdünnung 1 : 32, mikroskopisch Stufe 7 entsprechend Verdünnung 1 : 128.

Methode D erzielte makroskopisch Stufe 6, also Verdünnung 1 : 64 und mikroskopisch Stufe 7 - 8 oder Verdünnung 1 : 128 bis 1 : 256 (Tab. 19).

Überblickt man die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, so zeigt Methode E die höchsten Titerendpunkte. Diese übertreffen Methode D und A um durchschnittlich 1 - 2 und Methode C um 2 - 3 Stufen.

b) Spezifität:

Beim HPSST beobachten wir hin und wieder Präparate mit geringfügiger Geldrollenbildung, die die Ablesung jedoch nicht behinderte.

Die Titerendpunkte waren bei den Ficinverfahren makroskopisch relativ deutlich ablesbar, mikroskopisch z. T. nicht klar abzugrenzen, da eine Überlagerung durch unspezifische Agglutinationen erfolgte.

Diese waren bei Methode D am stärksten ausgeprägt. Von 20 Versuchen wiesen 39 Präparate "schwache", 17 "mittelstarke" und 3 "starke" Agglutinationen auf; 2 Versuche waren einwandfrei.

Von 20 Versuchen der Methode C zeigten 30 Gemische "schwache", 12 "mittelstarke" und 2 "starke" unspezifisch-positive Ausfälle. 1 Versuch war einwandfrei.

Die besten Ergebnisse erzielte unter den Ficinmethoden Verfahren E mit 21 "schwach", 5 "mittelstark" und 2 "stark" agglutinierten Präparaten. 5 Versuche waren ohne Beanstandung.

Unspezifisch-positive Ausfälle traten bevorzugt in Reaktionsgemischen von 1 - 2 Stufen höherer Verdünnung als die mikroskopischen Titerendstufen und in negativen Kontrollen in Erscheinung.

Als empfindlichstes und in Bezug auf die Spezifität der Agglutinate sicherstes Ficinverfahren hat sich die nach Wiener - Katz und Haber - Rosenfield modifizierte Methode (E) herausgestellt. Vergleicht man jedoch diese mit dem um 1 - 2 Stufen weniger empfindlichen HPSST, ergeben sich für die zuletztgenannte Methode folgende Vorteile:

1. geringfügige Streuung der Einzelwerte,
2. fast immer saubere Resultate und
3. geringerer Arbeits- und Zeitaufwand. Zur Durchführung des HPSST benötigt man 35 - 40, für Methode E 50 - 60 Minuten.

IV. Vergleichende Untersuchungen mit dem HPSST und dem Enzym-Slide-Test in verschiedenen Modifikationen unter Verwendung von B r o m e l i n

Der Leistungsvergleich zwischen dem HPSST und den einzelnen Enzymtestverfahren wird in den folgenden Untersuchungen mit vier verschiedenen handelsüblichen Bromelinpräparaten durchgeführt. Sie werden hier mit a, b, c und d bezeichnet.

Bromelin-a stellt ein lyophil getrocknetes Pulver dar, das zum Gebrauch in 5 ml aqua dest. aufgelöst werden muß. Die Lösung soll bei Kühlschranktemperatur bis zu 2 Wochen und tiefgefroren über mehrere Wochen haltbar sein.

Das ebenfalls in getrockneter Form vorliegende Bromelin-b wird in 2 ml eines mitgelieferten Lösungsmittels aufgelöst. Diese Lösung garantiert eine Haltbarkeit bei Raumtemperatur für 2 Wochen, bei Kühlschranktemperatur für mindestens 3 Monate.

Bromelin-c, ein "stabilisiertes, gepuffertes und getrocknetes" Präparat, wird vor Gebrauch in 5 ml aqua dest. aufgelöst. Im Kühlschrank soll diese Lösung mindestens 1 Woche stabil sein.

Bromelin-d unterscheidet sich von den bisher genannten Präparaten dadurch, daß es sich hier nicht nur um reines Bromelin, sondern um eine Mischung handelt. Es besteht in erster Linie aus Bromelin mit einem Zusatz von Ficin und Papain. Daher soll es im Rahmen der Bromelinuntersuchungen besprochen werden. Bromelin-d wird als stabilisierte, gebrauchsfertige Lösung geliefert. Diese soll bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt werden. Über die Haltbarkeitsdauer werden keine Angaben gemacht.

1. Untersuchungen mit Bromelin-a

Das Untersuchungsgut dieser Reihe umfaßt je 20, insgesamt 80 Kreuzserien, zwischen Anti-D-Serum und D-Erythrozyten.

Durchgeführt wurden folgende Methoden:

A HPSST

B EST: ungeschaukelter Test mit Erythrozytensuspension

C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension

D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment.

Für die Kreuzserien diente wieder eine 13-stufige Verdünnungsreihe des Ausgangsserums. Der HPSST wird, wie oben beschrieben, durchgeführt. Für die Enzymtestverfahren B und C verwenden wir eine 2 - 5 %ige Erythrozytensuspension in NaCl, für Methode D Erythrozytenkonzentrat. Für jede Serie wird eine negative Kontrolle angesetzt. Die Reaktionsgemische der mit C und D bezeichneten Verfahren werden bei 37° C 30 Min. geschaukelt. Die Herstellerfirma empfiehlt Methode B, bei der man die Gemische 15 - 20 Min. bei Raumtemperatur stehen läßt. Alle Resultate werden makroskopisch und mikroskopisch abgelesen.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerstufen (Tab. 4):

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode B in 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten wiesen 9 Versuche keinen Titerunterschied, 5 Versuche einen Unterschied von 1 Stufe und 4 einen solchen von 2 Stufen zugunsten der Methode B auf. In 2 Fällen ergab sich ein Unterschied von 1 Stufe zugunsten der Methode A.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode C in 20 Versuchen zeigten 4 Fälle einen Titerunterschied von 1 Stufe, je 8 Fälle einen solchen von 2 bzw. 3 Stufen zugunsten der Methode C.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode D in 20 Versuchen ergaben 1 Versuch einen Titerunterschied von 3, 5 Versuche einen Unterschied von 4, 12 einen solchen von 5 und 2 einen Unterschied von 6 Stufen zugunsten der Methode D (Tab. 14).

Die Einzelwerte der Enzymverfahren liegen in einem Bereich, der nicht mehr als 4 Verdünnungsstufen umfaßt. Die Streuung ist also nicht so ausgeprägt wie in der vorhergehenden Untersuchungsreihe.

Die vom HPSST im Durchschnitt erreichten Titerhöhen lagen makroskopisch bei Stufe 6 - 7 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 64 bis 1 : 128, mikroskopisch bei Stufe 8 - 9, d. h. Verdünnung 1 : 256 bis 1 : 512.

Unter den mit Bromelin-a durchgeführten Enzymverfahren erreichte Methode B makroskopisch Stufe 7, also Verdünnung 1 : 128, mikroskopisch Stufe 8 - 9, d. h. Verdünnung 1 : 256 bis 1 : 512.

Methode C lag makroskopisch bei Titerstufe 9 oder Verdünnung 1 : 512, mikroskopisch bei Stufe 10 - 11, also Verdünnung 1 : 1024 bis 1 : 2048.

Methode D erreichte makroskopisch Stufe 11 - 12, d. h. Verdünnung 1 : 2048 bis 1 : 4096, mikroskopisch Stufe 13 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 8192 (Tab.20).

Die Versuchsergebnisse zeigen eindeutig die quantitative Überlegenheit der Methode D. Sie übertrifft Methode C um makroskopisch und mikroskopisch durchschnittlich 2 - 3 und Methode B sowie Methode A um 4 - 5 Stufen.

b) Spezifität:

Der HPSST zeigte trotz gelegentlicher Geldrollenbildung makroskopisch wie mikroskopisch einwandfreie Resultate.

Die makroskopischen Titerendpunkte waren bei allen Bromelintestverfahren besonders scharf und daher gut ablesbar. Im mikroskopischen Bereich fanden wir wieder unspezifisch-positive Reaktionsausfälle.

Diese waren bei Methode D verstärkt ausgeprägt: von 20 Kreuzserien wiesen 3 Präparate "schwache",

11 "mittelstarke" und 8 "starke" Agglutinationen auf. 1 Versuch war einwandfrei.

Bei Methode C zeigten 32 Gemische "schwache", 9 "mittelstarke" und 4 "starke" Agglutinationen. 3 Versuche waren einwandfrei.

Methode B ergab mit 15 "schwach" agglutinierten Präparaten und 12 einwandfreien Kreuzserien die qualitativ besten Ergebnisse unter den Bromelin-a-Methoden.

Bei Methode D waren die mit "stark" bezeichneten Agglutinate häufig in negativen Kontrollen anzutreffen. Dort wurden neben einigen auffallend grobscholligen Zusammenballungen in unteren Schichten auch geldrollenartige Erythrozytenansammlungen beobachtet.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Neigung zu unspezifischen Zusammenballungen der Erythrozyten mit wachsender Empfindlichkeit der Enzymverfahren zunimmt: Methode D, die 2 - 5 Stufen empfindlicher als die übrigen reagiert, erbringt die meisten "mittelstark" und "stark" unspezifisch agglutinierten Präparate. Der HPSST hat sich bei konstanter Empfindlichkeit bezüglich der Spezifität der Agglutinate als geeignetere Methode erwiesen.

2. Untersuchungen mit Bromelin-b

Das Untersuchungsgut dieser Reihe bestand aus je 20, insgesamt 80 Kreuzserien zwischen Anti-D-Serum und D-Erythrozyten. 4 Methoden wurden angewandt:

A HPSST
B EST: ungeschaukelter Test mit Erythrozytensuspension
C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension
D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment

Die Durchführung der genannten Methoden erfolgte in der vorher beschriebenen Weise. Für Methode B und C stellten wir eine mit 5 - 10 % angegebene Erythrozyten-

suspension in NaCl her. Für Methode D wurde Erythrozytensediment verwendet. Ergänzend muß bemerkt werden, daß von der Herstellerfirma der Bromelin-b- und Bromelin-c-Präparate als serologische Kreuzprobe nur die Röhrchenmethode empfohlen wird. Wir führten daher mit den genannten Präparaten den Objektträgertest wie für Bromelin-a angegeben durch.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerstufen (Tab. 5):
Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode B in 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten wiesen 7 Versuche keinen Titerunterschied, 6 einen Unterschied von 1 Stufe und 1 Versuch einen solchen von 2 Stufen zugunsten der Methode B auf. 4 Versuche zeigten einen Unterschied von 1 Stufe und 2 einen von 2 Stufen zugunsten der Methode A.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode C in 20 Versuchen wiesen 6 Versuche keinen Titerunterschied, 8 Versuche einen Unterschied von 1 Stufe, 2 einen solchen von 2 und 4 Versuche von 3 Stufen zugunsten der Methode C auf.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode D in 20 Versuchen zeigten 7 Versuche einen Titerunterschied von 2, 2 Versuche einen Unterschied von 3, 3 Versuche einen von 4 und 8 einen Titerunterschied von 5 Stufen zugunsten der Methode D (Tab. 15).

Bei den Methoden B, C und D fällt wieder eine stärkere Streuung der makroskopischen und mikroskopischen Einzelwerte im Vergleich zu den mit Bromelin-a durchgeführten Versuchen auf. Die Titerendpunkte bewegen sich in einem Bereich, der rund 5 Verdünnungsstufen umfaßt.

Die durchschnittlich erreichten Titerhöhen lagen beim HPSST makroskopisch bei Stufe 6 - 7 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 64 bis 1 : 128, mikroskopisch bei Stufe 8 - 9 oder Verdünnung 1 : 256 bis 1 : 512.

Unter den mit Bromelin-b durchgeführten Verfahren erreichte Methode B makroskopisch Titerstufe 7, also Verdünnung 1 : 128, mikroskopisch Stufe 8 - 9, d. h. Verdünnung 1 : 256 bis 1 : 512.

Methode C lag makroskopisch bei Stufe 8, gleichbedeutend mit einer Verdünnung von 1 : 256, mikroskopisch bei einer Stufe 9 - 10 oder Verdünnung 1 : 512 bis 1 : 1024.

Methode D erzielte makroskopisch Stufe 10 - 11, also Verdünnung 1 : 1024 bis 1 : 2048, mikroskopisch Stufe 12 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 4096 (Tab. 21).

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß das empfindlichste Testverfahren wieder Methode D darstellt. Sie übertrifft Methode C um makroskopisch wie mikroskopisch im Durchschnitt 2 - 3, Methode B und A um 3 - 4 Stufen.

b) Spezifität:

Der HPSST brachte eindeutig ablesbare Resultate hervor. Alle mitgeführten Kontrollen waren negativ.

Unspezifisch-positive Reaktionen traten wieder verstärkt in den Enzymmethoden D und - etwas schwächer - bei C in Erscheinung. In 20 Versuchen der Methode D wiesen 12 Präparate "schwache", 15 "mittelstarke" und 13 "starke" Agglutinationen auf. 9 davon betrafen negative Kontrollen! 1 Serie war einwandfrei.

Bei Methode C zeigten 35 Präparate "schwache", 11 "mittelstarke" und 4 "starke" unspezifisch positive Ausfälle. 1 Versuch war ohne Beanstandung.

Die nicht geschaukelte Methode B erbrachte mit 17 "schwach" agglutinierten Präparaten und 7 einwandfreien Versuchen die qualitativ besten Ergebnisse unter den Enzymverfahren.

Betrachtet man die Ergebnisse der mit Bromelin-b durchgeführten Untersuchungen, so ist auch hier eine

quantitativ gesehen höchste Leistungsfähigkeit - bei Methode D, die die anderen Verfahren um mindestens 2 - 3 Titerstufen übertrifft - mit verstärkter unspezifischer Agglutinationsneigung verbunden. Der Wert dieses Testes wird dadurch herabgesetzt.

3. Untersuchungen mit Bromelin-c

Das Untersuchungsgut dieser Reihe setzte sich aus je 20, insgesamt 80 Kreuzserien zwischen Anti-D-Serum und D-Erythrozyten zusammen. Folgende Methoden kamen zur Anwendung:

A HPSST
B EST: ungeschaukelter Test mit Erythrozytensuspension
C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension
D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment

Alle Methoden wurden, wie in den vorhergehenden Versuchsreihen beschrieben, durchgeführt. Für Methode B und C verwendeten wir laut Vorschrift eine 2 %ige Erythrozytensuspension in NaCl.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerstufen (Tab. 6):
Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode B in 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten zeigten 4 Versuche einen Titerunterschied von 1 Stufe, 7 Versuche einen solchen von 2, 5 Versuche einen von 3 und 4 Versuche einen Unterschied von 4 Stufen zugunsten des HPSST.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode C in 20 Versuchen wiesen 6 Fälle keinen Titerunterschied, 7 Fälle einen Unterschied von 1 Stufe und 4 einen solchen von 2 Stufen zugunsten der Methode C auf. 3 Versuche zeigten einen Unterschied von 1 Stufe zugunsten des HPSST.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode D in 20 Ver-

suchen wies 1 Versuch keinen Titerunterschied auf, 3 Versuche zeigten einen Unterschied von 1 Stufe, 6 einen solchen von 2, 8 einen von 3 und 2 Versuche einen Unterschied von 4 Stufen zugunsten der Methode D (Tab. 16).

Auch hier beobachtet man, daß die einzelnen Titerwerte der Enzymmethoden z. T. nicht wenig voneinander abweichen. So liegen sie bei Methode D mikroskopisch wie makroskopisch in einem Bereich, der 5 aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen umfaßt. Dabei muß die Bevorzugung einer bestimmten Stufe beachtet werden.

Die durchschnittlich erreichten Titerhöhen liegen beim HPSST makroskopisch bei Titerstufe 6 - 7, also einer Verdünnung von 1 : 64 bis 1 : 128, mikroskopisch bei Stufe 8 - 9 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 256 bis 1 : 512.

Unter den mit Bromelin-c durchgeführten Verfahren erreichte Methode B makroskopisch Titerstufe 4, also Verdünnung 1 : 16, mikroskopisch Stufe 6 oder Verdünnung 1 : 64.

Methode C lag makroskopisch bei Stufe 7 - 8, d. h. Verdünnung 1 : 128 bis 1 : 256, mikroskopisch bei Stufe 9, gleichbedeutend mit einer Verdünnung von 1 : 512.

Methode D erreichte makroskopisch Stufe 9 oder eine Verdünnung von 1 : 512, mikroskopisch Stufe 10 - 11 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 1024 bis 1 : 1048 (Tab. 22).

Überblickt man die Ergebnisse, so zeigt sich, daß Methode D die empfindlichsten Resultate erzielte. Diese übertreffen Methode C um makroskopisch wie mikroskopisch 1 - 2, Methode A um makroskopisch 2 - 3 und mikroskopisch 2, sowie Methode B um makroskopisch 5 und mikroskopisch 4 - 5 Stufen. Hervorzuheben ist, daß in dieser Versuchsreihe Methode B 2 - 3 Stufen

unter den Titerwerten des HPSST liegt!

b) Spezifität:

Der HPSST erbrachte bei geringfügiger Geldrollenbildung klar ablesbare Ergebnisse. Die Kontrollen fielen bis auf 1 zweifelhaft positive Ausnahme negativ aus.

Unter den Enzymmethoden zeigte sich - am stärksten bei Methode D ausgeprägt - die Neigung zu unspezifisch positiven Reaktionsausfällen. In 20 Versuchen fanden sich 20 Präparate mit "schwachen", 12 mit "mittelstarken" und 4 mit "starken" unspezifischen Agglutinationen. 1 Versuch war einwandfrei.

Bei Methode C konnten in 20 Versuchen 18 "schwache" und 10 "mittelstarke" Agglutinationen festgestellt werden. 4 Versuche waren ohne Beanstandung.

Methode B schließlich zeigte 10 Präparate mit "schwach" und 2 mit "mittelstark" agglutinierten Reaktionen. 10 Versuche waren einwandfrei.

Die mit Bromelin-c durchgeführten Untersuchungen ergaben auch hier die quantitative Überlegenheit der Methode D, die gleichzeitig die stärksten unspezifisch positiven Ausfälle zeigte.

4. Untersuchungen mit Bromelin-d

Das Untersuchungsgut dieser Reihe umfaßte auch hier 80 Kreuzserien zwischen Anti-D-Serum und D-Erythrozyten. Folgende Methoden wurden durchgeführt:

A HPSST
B EST: ungeschaukelter Test mit Erythrozytensuspension
C EST: Schaukeltest mit Erythrozytensuspension
D EST: Schaukeltest mit Erythrozytensediment

A, B, C und D wurden, wie früher beschrieben, durchgeführt. Für Methode B und C verwendeten wir eine 10 %ige Erythrozytensuspension in NaCl. Methode B

entspricht dem vorgeschriebenen Objektträger-Kreuztest.

Ergebnisse:

a) Erreichte Titerstufen (Tab. 7):

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode B in 20 Versuchen Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten wiesen 4 Versuche keinen Titerunterschied auf, 8 Versuche einen Unterschied von 1 Stufe, 4 Versuche einen solchen von 2 und 2 einen von 3 Stufen zugunsten des HPSST. 2 Versuche zeigten einen Titerunterschied von 1 Stufe zugunsten der Methode B.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode C ergaben 9 Versuche keinen Titerunterschied, 5 Versuche einen solchen von 1 Stufe und 1 Versuch einen von 2 Stufen zugunsten des HPSST. 2 Fälle wiesen einen Titerunterschied von 1 Stufe und 3 Fälle einen solchen von 2 Stufen zugunsten der Methode C auf.

Beim Vergleich zwischen HPSST und Methode D zeigten je 4 Versuche einen Titerunterschied von 1, 2 bzw. 3, 6 Versuche einen solchen von 4 und je 1 Versuch einen Unterschied von 5 bzw. 6 Stufen zugunsten der Methode D (Tab. 17). Bei Betrachtung der Einzelergebnisse fiel besonders bei Methode D eine starke Streuung der Werte auf. Die Streuungsbreite umfaßte makroskopisch wie mikroskopisch 6 aufeinander folgende Verdünnungsstufen. Die Konzentrierung der Titerwerte auf eine bestimmte Stufe ist nur schwach ausgeprägt. Im Vergleich dazu bewegen sich die Titerwerte des HPSST in einem nur 3 Stufen umfassenden Bereich.

Die durchschnittlich erreichten Titerhöhen liegen beim HPSST makroskopisch bei Titerstufe 7, d. h. einer Verdünnung von 1 : 128, mikroskopisch bei 9 entsprechend einer Verdünnung von 1 : 512.

Unter den mit Bromelin-d durchgeführten Methoden erreichte Methode B makroskopisch Stufe 6 oder Verdünnung 1 : 64, mikroskopisch Stufe 8, also Verdünnung 1 : 256.

Methode C erzielte makroskopisch Stufe 8 oder Verdünnung 1 : 256, mikroskopisch Stufe 9, was einer Verdünnung von 1 : 512 entspricht.

Methode D erreichte makroskopisch Stufe 10, d. h. eine Verdünnung von 1 : 1024 und mikroskopisch Stufe 12 oder Verdünnung 1 : 4096 (Tab. 23).

Der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse zeigt, daß Methode D die übrigen Verfahren an Empfindlichkeit übertrifft. Sie reagiert makroskopisch und mikroskopisch im Durchschnitt 2 - 3 Stufen empfindlicher als Methode C, 3 Stufen empfindlicher als A und 4 Stufen empfindlicher als B.

b) Spezifität:

Der HPSST lieferte wieder klar ablesbare Resultate. Alle mitgeführten Kontrollen waren negativ.

Unter den mit Bromelin-d durchgeführten Enzymverfahren wiesen in 20 Versuchen der Methode D 13 Reaktionsgemische "schwache", 16 "mittelstarke" und 13 "starke" Agglutinationen auf. 1 Versuch war einwandfrei.

Bei Methode C zeigten 27 Präparate "schwache", 19 "mittelstarke" und 3 "starke" unspezifische Agglutinationen. Kein Versuch war ohne Beanstandung.

Methode B schließlich wies 41 "schwach" und 8 "mittelstark" agglutinierte Präparate auf. 3 Versuche waren einwandfrei.

Das Gesamtergebnis dieser Untersuchungen unterscheidet sich nur wenig von dem mit Bromelin-a, -b und -c erhaltenen Resultat. Die Papain- und Ficinkomponente

in Bromelin-d scheint also ohne wesentlichen Einfluß auf die Bromelinwirkung zu sein. Wieder steht Methode D an der Spitze der erreichten Titerstufen, ist jedoch in Bezug auf die Spezifität der Agglutinate dem HPSST unterlegen.

Ein kurzer Vergleich zwischen den Ergebnissen der mit Bromelin-a, -b, -c und -d durchgeführten Untersuchungen läßt einmal erkennen, daß mit Bromelin-a die höchsten Titer erreicht wurden. Mit einem Empfindlichkeitsabfall von 1 - 2 Stufen folgen Bromelin-b und -d, mit einem solchen von 2 - 3 Stufen Bromelin-c. Auf der anderen Seite war die Ablesbarkeit der Resultate, insbesondere bei Methode D durch Bildung unspezifischer Agglutinationen beeinträchtigt. Diese traten besonders stark bei Bromelin-d und -b, etwas weniger bei Bromelin-c und am geringsten bei Bromelin-a in Erscheinung.

V. Durchführung von 300 Einzelkreuzproben mit dem Papain-, Ficin- und Bromelinverfahren

In der folgenden Untersuchung sollen die Papain-, sowie die Ficin- und Bromelinmethode auf ihre praktische Anwendbarkeit im täglich durchgeführten Kreuztest eines serologischen Labors geprüft werden. Wir vergleichen jeweils die gewonnenen Versuchsergebnisse mit den Resultaten des HPSST und Coombstests, die z. Zt. als Kreuzproben routinemäßig von der Tübinger Blutzentrale durchgeführt werden.

Das Untersuchungsgut umfaßte je Enzym 100, insgesamt 300 Kreuzproben, in denen die Verträglichkeit zwischen Empfängerserum und entsprechend ausgewählten Spendererythrozyten getestet wurde.

Die Proben führten wir unter gleichen Versuchsbedingungen - wie in Methode D der vorhergegangenen Untersuchungsreihen beschrieben - als Enzymschaukeltest mit Sediment

unter Verwendung der genannten Enzyme durch. Diese Modifikation entspricht der hier üblichen Kreuzprobentechnik.

Ergebnisse (Tab. 9):

1. 100 Kreuzproben mit Papain

Von 100 Papainkreuzproben waren 52 Präparate makroskopisch und mikroskopisch eindeutig negativ. Als makroskopisch positiv konnte keine Probe bezeichnet werden. Bei 41 Präparaten fanden wir mikroskopisch "schwache", bei 7 "mittelstarke" und bei 2 "starke" unspezifische Agglutinationen. Die "schwach" agglutinierten Gemische werden bei geübtem Blick meist noch als negativ angesehen. Problematisch sind dagegen die übrigen Fälle. Hier ist die Ablesung erheblich erschwert und tendiert größtenteils zu "zweifelhaft positiv". Nur in 1 Fall dieser 9 Präparate bestätigten HPSST und Coombstest das Ergebnis. 99 Gemische fielen nach den letztgenannten Tests negativ aus. Das transfundierte Blut wurde in all diesen Fällen auch anstandslos vertragen.

Damit ist bewiesen, daß es sich bei den restlichen 8 Fällen mit großer Wahrscheinlichkeit um unspezifische Reaktionen handelte.

2. 100 Kreuzproben mit Ficin

Von 100 Ficinkreuzproben waren 70 Präparate makroskopisch und mikroskopisch negativ. Makroskopisch positiv war kein Präparat. 23 Fälle wiesen mikroskopisch "schwache", 5 "mittelstarke" und 2 "starke" Agglutinationen auf. In 7 Fällen waren wir also nicht sicher, ob es sich um positive oder negative Ergebnisse handelte. Der Vergleich mit dem HPSST und Coombstest, die in allen Versuchen negative Resultate brachten, zeigte, daß es sich bei den oben angeführten Präparaten wieder nicht um echte, sondern um unspezifisch positive Reaktionen handelte.

3. 100 Kreuzproben mit Bromelin (Bromelin-a)

Von 100 mit Bromelin durchgeführten Kreuzproben zeigten 57 Präparate makroskopisch wie mikroskopisch eindeutig negative Resultate; makroskopisch erhielten wir keine positiven Ergebnisse. 31 Präparate waren "schwach", 9 "mittelstark" und 3 Präparate "stark" agglutiniert. Die beiden letztgenannten Gruppen umfaßten also 12 "zweifelhaft positive" Ausfälle. Der HPSST bestätigte in 1, der Coombstest in 2 Fällen die Richtigkeit dieser Diagnose. Die übrigen Fälle zeigten in diesen Tests keine Agglutinationen. Somit handelte es sich bei 10 Präparaten wieder um unspezifisch positive Reaktionsausfälle.

Betrachtet und vergleicht man die Ergebnisse der mit Papain, Ficin und Bromelin durchgeführten Kreuzproben, ergibt sich in Bezug auf ihre zunehmende Neigung zu "mittelstarken" bis "starken" unspezifischen Ausfällen nachstehende Reihenfolge der Enzymmethoden: Ficintest, Papaintest, Bromelintest. Der relativ hohe Prozentsatz an zweifelhaften Ergebnissen stellt die Einführung dieses Kreuzverfahrens in die Praxis sehr in Frage. Um positive Ausfälle sicher auszuschließen, müssen die Ergebnisse bewährter Methoden zu Rate gezogen werden. Das bedeutet, daß man gleichzeitig mehrere Proben ansetzen muß, was einen vermehrten Arbeitsaufwand mit sich bringt.

III. Zusammenfassung und Diskussion

Am Beginn dieser Arbeit wiesen wir auf die grundlegende Bedeutung der serologischen Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) vor jeder Bluttransfusion hin.

Der Kreuztest beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die beim Vorliegen von Immunantikörpern, wie sie bei Sensibilisierungsvorgängen entstehen (s. S. 1), als Agglutination der Erythrozyten sichtbar wird. Durch die routinemäßige Anwendung geeigneter Testmethoden läßt sich die Häufigkeit gefährlicher Transfusionszwischenfälle herabsetzen. Bei der ausführlichen Darstellung mehrerer Kreuztestverfahren erkannten wir, daß sich diese in Bezug auf den Nachweis verschiedener Antikörper, die Empfindlichkeit, die Spezifität der Reaktion sowie ihre technische Durchführbarkeit mehrfach erheblich unterscheiden.

Auf der Suche nach weiteren leistungsfähigen und zugleich einfach durchführbaren serologischen Verträglichkeitsproben wurden in neuerer Zeit die Enzymteste als sehr empfindliche Methoden beschrieben (vgl. S. 4 f).

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zwischen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (HPSST nach W. Schneider) und einigen Enzymmethoden angestellt.

Der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (HPSST) unterscheidet sich vom einfachen Hochprotein-Slide-Test (HPST) dadurch, daß hier die Reaktionsgemische während der gesamten Inkubationszeit durch ein Schaukelgerät in ständiger, sanfter Bewegung gehalten werden[37]. Untersuchungen von P. CORNILS[8] ergaben, daß auf diese Weise die Empfindlichkeit des HPST um durchschnittlich zwei Titerstufen gesteigert werden konnte. Auch wir konnten bestätigen, daß der Schaukeltest eine um 1 - 2 Stufen empfindlichere Methode im Vergleich zum HPST darstellt (s. Versuchsreihe I, S. 19).

Der HPSST (Methode A) wurde bei allen Untersuchungen mit 2 %iger Erythrozytensuspension in AB-Serum unter Verwendung von 20 %igem Rinderalbumin durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug bei 37° C 30 Minuten.

Der Enzym-Slide-Test (EST) kam in verschiedenen Modifikationen zur Anwendung:

1. Ungeschaukelter EST mit 2 - 10 %iger Erythrozytensuspension; Inkubation: 15 Min. bei Zimmertemperatur (20° C) (Methode B).
2. Geschaukelter EST mit Erythrozytenvorbehandlung, modifiziert nach WIENER-KATZ und HABER-ROSENFIELD (15); Inkubation: 30 Min. bei 37° C (Methode E).
3. Geschaukelter EST mit 2 - 10 %iger Erythrozytensuspension; Inkubation: 30 Min. bei 37° C (Methode C).
4. Geschaukelter EST mit Erythrozytensediment; Inkubation: 30 Min. bei 37° C (Methode D).

Für die genannten Enzymmethoden verwandten wir Fertigpräparate von Papain, Ficin und Bromelin.

Die vergleichenden Titerbestimmungen mit insgesamt 520 Kreuzserien erstreckten sich innerhalb des Rh-Systems auf den Nachweis eines Anti-D. Als Testerythrozyten dienten Spenderblutkörperchen, die mit dem entsprechenden Antigen D ausgestattet waren.

Außerdem führten wir 300 Einzelkreuzproben durch.

Als Kriterien für die Beurteilung der Brauchbarkeit eines Verfahrens wurden in erster Linie der Titerausfall und die Ablesbarkeit der Reaktionen herangezogen. Auf die Struktur der unspezifischen Agglutinate (Pseudoagglutinationen) wurde besonders geachtet.

Wir erhielten folgende Untersuchungsergebnisse (Tab. 8, Tab. 10):
Beim Vergleich zwischen dem HPSST und den Papainmethoden B, C und D erreichte der geschaukelte EST mit Erythrozytensediment die höchsten Antikörpertiter. Mit einem Empfindlichkeitsabfall von 1 - 2, 2 bzw. 2 - 3 Titerstufen folgen Methode C, A bzw. B. Im Gegensatz

zum einwandfrei beurteilbaren HPSST (gelegentlich geringfügige Geldrollenbildung) erschwerten bei sämtlichen Enzymmethoden, am stärksten bei Methode D, unspezifische Agglutinationen die Ablesung.

Unter den mit Ficin durchgeführten Methoden B, C und D erwies sich der EST mit Erythrozytenvorbehandlung als leistungsfähigstes Verfahren im Nachweis eines Immun-Anti-D. Es übertraf Test A um 1 - 2, D um 2 und C um 2 - 3 Titerstufen. Die Neigung zu unspezifischen Reaktionsausfällen unter den Ficinverfahren war bei Methode B schwach, bei C stärker und bei D besonders stark ausgeprägt. Die zuverlässigste und zugleich empfindlichste Ficinmethode stellt somit Verfahren B dar, ist aber dem HPSST gegenüber hinsichtlich unspezifischer Pseudoagglutinationsbildungen anfälliger.

Der Vergleich zwischen HPSST und den Bromelintestverfahren B, C und D, mit jeweils 4 verschiedenen Präparaten durchgeführt, zeigte in allen Versuchen die empfindlichsten Ergebnisse bei der geschaukelten Enzymmethode mit Erythrozytensediment (D). Die höchsten Antikörpertiter wurden unter Verwendung von Bromelin-a beobachtet. Darauf folgen Bromelin-b mit 1, Bromelin-d mit 1 - 2 und Bromelin-c mit 2 - 3 Titerstufen Empfindlichkeitsabfall. Methode C lag in einem Bereich von 1 - 3 und Methode B von 3 - 5 Titerstufen unter Methode D. Der HPSST zeigte immer konstante Ergebnisse. Die Ablesbarkeit der mit Bromelin gewonnenen Ergebnisse wurde wiederum durch unspezifische Reaktionen beeinträchtigt. Wir fanden diese in stärkster Ausprägung bei den Methoden D und C. Die günstigsten Resultate erhielten wir mit Bromelin-a - in Methode D angewandt -, da es bei höchster Empfindlichkeit in geringstem Maße zur Bildung unspezifischer Agglutinationen neigte.

Die mit Papain, Ficin, Bromelin durchgeführten Einzelkreuzproben führten zu folgendem Resultat: Von 100 Einzelproben wurden im Ficintest je 7, im Papaintest 9 und im

Bromelintest 12 Präparate mikroskopisch als "zweifelhaft positiv" diagnostiziert.

Der HPSST und der Coombs-Test bestätigten jedoch aus dieser Reihe von insgesamt 28 "zweifelhaften" Resultaten nur in 3 Fällen die Spezifität der Ergebnisse.

Ergebnis:

1. Der Enzymtest stellt für den Nachweis eines Antikörpers im Rh-System eine sehr empfindliche Methode dar.

Als leistungsfähigstes Verfahren erkannten wir im Papain- und Bromelin-Test die Schaukelmethode mit Erythrozytensediment (D), im Ficin-Test hingegen war es die Erythrozytenvorbehandlungstechnik (E). Damit war es möglich , die durchschnittlich erreichten Titerhöhen des Hochprotein-Slide-Schaukel-Tests (HPSST nach Schneider) um 1 - 2 Stufen im Ficin-, um 2 Stufen im Papain- und 4 - 5 Stufen im Bromelin-Test zu übertreffen. Wie beim HPSST konnte im Enzymtest der empfindlichkeitssteigernde Effekt der Schaukel veranschaulicht werden: die von manchen Firmen empfohlene, ungeschaukelte Methode B lag mit ihren Titerwerten im Durchschnitt 2 bzw. 3 Stufen unter denen der geschaukelten Methoden C bzw. D.

2. Der Enzymtest zeigt bei mikroskopischer Betrachtung zum Teil das Phänomen unspezifischer Agglutinationen.

In den Versuchsreihen fällt auf, daß die während der Inkubation geschaukelten Präparate in viel stärkerem Maße zu solchen Nebenerscheinungen neigen als die ungeschaukelten. Eine Ausnahme hiervon bildet der Ficin-Test in der nach Wiener-Katz und Haber-Rosenfield modifizierten Methode (E). Die Ursache ist vermutlich darin zu suchen, daß das Enzym während der Inkubation nicht auf die Erythrozyten einwirken kann, da es bereits vorher entfernt wird. Das Verbleiben des Enzyms im Reaktionsgemisch während der gesamten Inkubationszeit scheint also eine zusätzlich agglutinationsfördernde und zum Teil oberflächenzerstörende Wirkung auf die Erythrozyten auszuüben.

Hierbei wäre zu erwägen, ob auch höhere Temperaturen (37° C) beim Zustandekommen der Agglutinationen eine Rolle spielen. Die Beurteilung solcher Präparate, die durch unspezifische Zusammenballungen überlagert sind, ist nicht einfach und eine Entscheidung gelegentlich unmöglich.

3. Der Enzymtest als Schaukelmethode mit Erythrozytensediment (D) ist den übrigen Modifikationen vorzuziehen.

Die Vorteile der Methode D liegen einmal in ihrer einfachen Durchführung, bei der u. a. keine Erythrozytensuspensionen hergestellt werden müssen, zum anderen in den besonders empfindlichen Reaktionsergebnissen, die schon dadurch, daß eine zusätzliche Verdünnung des Antikörpers durch die Suspension vermieden wird, im Durchschnitt um mindestens eine halbe Stufe gesteigert werden können. Zum Ficin-Verfahren E ist noch zu bemerken, daß dieser im Bezug auf Leistungsfähigkeit und Spezifität befriedigende Test ein umständliches und somit zeitraubendes Verfahren darstellt, das für die Praxis weniger in Frage kommt.

4. Bei Verwendung von Enzympräparaten müssen die Labilität dieser Stoffe, ihre Empfindlichkeit gegenüber bakterieller Verunreinigung und evtl. auftretende Schleimhautreizungen beim Untersucher (besonders bei Ficin) berücksichtigt werden.

5. Der zum Vergleich mitgeführte HPSST erwies sich bei konstanter Empfindlichkeit als durchweg zuverlässige Methode.

Sein wesentlicher Vorteil gegenüber den Enzymverfahren besteht darin, daß er stets einwandfrei beurteilbare Ergebnisse zeigt. Gelegentlich auftauchende Geldrollenbildungen waren immer leicht zu erkennen und in keinem Fall den unspezifischen Zusammenballungen des Enzymtests vergleichbar.

Abschließend erhebt sich die Frage nach der Anwendungsmöglichkeit der Enzymmethode in der Routine-Antikörper-Diagnostik. Als Haupttest scheidet das Verfahren grundsätzlich aus, da bestimmte Antigene durch Enzyme zerstört werden (s. Tab. S. 9). Nachteilig wirkt sich außerdem die von uns beobachtete Neigung zu unspezifischen Reaktionsausfällen aus. Damit kommt der Enzymtest als einzige Ergänzung zu einem Haupttest praktisch nicht in Frage. Die bewährte Kombination von Hochprotein-Slide-Schaukel-Test (als Haupttest) und Coombstest (als Ergänzung) dürfte daher auch in Zukunft als leistungsfähigstes Antikörpernachweisverfahren anzusehen sein. Der Enzymtest sollte nur in unklaren Fällen zur weiteren Deutung herangezogen werden.

Tab. 1

I. Erreichte Titerhöhen mit dem HPST und dem HPSST

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	HPST mit 2 % Ery-Suspension nicht geschaukelt 30'/37° C		HPSST mit 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	32	128	32	128
2	32	128	256	1024
3	32	128	256	512
4	32	256	256	512
5	16	64	128	256
6	32	128	64	512
7	32	256	128	512
8	32	128	128	256
9	32	128	256	256
10	32	256	64	1024
11	32	128	32	256
12	32	128	64	256
13	64	128	64	256
14	32	256	128	512
15	16	64	128	512
16	64	128	32	256
17	32	256	64	512
18	32	128	256	256
19	64	256	32	512
20	32	256	64	512

Tab. 2

II. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Papaintest

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	A HPSST mit 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		B Papaintest m.5-10% Ery-Suspension nicht geschaukelt 30'/37° C		C Papaintest m.5-10% Ery-Suspension geschaukelt 30'/ 37° C		D Papaintest mit Ery-Sediment geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	32	128	64	256	128	1024	512	2048
2	64	512	32	128	128	512	128	512
3	256	512	64	512	256	1024	256	512
4	256	512	64	256	256	1024	256	1024
5	128	512	128	512	512	1024	512	2048
6	256	1024	64	256	256	1024	512	2048
7	128	256	64	256	128	256	256	1024
8	64	128	64	256	256	1024	256	1024
9	128	512	64	256	256	1024	1024	4096
10	256	1024	256	512	256	1024	512	2048
11	128	512	64	256	512	2048	256	1024
12	64	256	128	512	256	512	256	1024
13	64	128	64	256	128	1024	256	1024
14	32	256	64	256	128	512	512	1024
15	64	256	32	256	128	1024	256	1024
16	64	512	32	128	128	512	256	1024
17	32	256	64	256	128	512	256	1024
18	32	256	64	256	128	1024	256	1024
19	128	512	32	128	256	1024	512	2048
20	64	256	32	128	512	2048	256	1024

Tab. 3

III. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Ficintest

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	A HPSST mit 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		E Ficintest m.6-8 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		C Ficintest m.6 - 8 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		D Ficintest m. Ery-Sediment geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	32	128	128	512	32	128	64	256
2	128	512	64	256	16	64	8	32
3	64	512	64	256	8	32	8	16
4	64	256	512	2048	4	16	16	64
5	32	128	64	256	32	128	16	64
6	64	256	256	1024	32	128	32	64
7	128	256	128	512	32	128	64	512
8	64	256	256	512	64	256	128	512
9	64	256	64	256	64	256	256	1024
10	64	512	512	2048	16	64	32	128
11	32	128	64	256	32	128	64	256
12	128	512	256	1024	32	128	16	64
13	64	256	256	1024	64	256	256	512
14	64	256	256	1024	32	128	128	512
15	32	128	256	1024	16	64	32	128
16	64	512	128	512	128	512	256	1024
17	64	256	256	1024	128	512	128	256
18	32	128	64	256	64	256	64	128
19	64	256	1024	4096	64	512	128	512
20	64	256	256	1024	16	64	64	256

Tab. 4

IV./1. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Bromelintest (Bromelin-a)

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	A HPSST m. 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		B Bromelintest m.2-5 % Ery-Suspension nicht geschaukelt 15'/20° C		C Bromelintest m.2-5 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		D Bromelintest m. Ery-Sediment geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	128	512	512	1024	1024	4096	4096	8192
2	128	512	512	2048	1024	2048	4096	16384
3	64	256	128	256	512	1024	8192	8192
4	128	512	256	1024	1024	2048	8192	16384
5	64	128	128	512	512	1024	2048	8192
6	128	512	128	512	512	2048	2048	8192
7	64	256	128	256	256	512	4096	16384
8	128	512	128	256	256	1024	2048	8192
9	128	512	128	512	1024	2048	4096	16384
10	64	512	64	256	512	2048	4096	16384
11	64	256	256	1024	1024	2048	2048	8192
12	64	256	256	1024	512	2048	2048	8192
13	64	256	128	512	512	2048	2048	8192
14	64	256	128	256	512	2048	2048	8192
15	64	256	128	512	256	1024	2048	8192
16	64	128	64	256	256	1024	1024	4096
17	64	256	64	256	256	512	2048	8192
18	256	512	128	512	1024	4096	1024	4096
19	64	256	128	256	256	512	1024	4096
20	128	512	128	512	512	2048	4096	8192

Tab. 5

IV./2. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Bromelintest (Bromelin-b)

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

	A		B		C		D	
	HPSST		Bromelintest		Bromelintest		Bromelintest	
	m. 2 % Ery-Suspension geschaukelt		m. 5-10 % Ery-Suspension nicht geschaukelt		m.5-10 % Ery-Suspension geschaukelt		m. Ery-Sediment geschaukelt	
Versuch	30'/37° C		15'/20° C		30'/37° C		30'/37° C	
Nr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	32	128	32	128	128	256	512	1024
2	256	1024	64	256	256	1024	1024	4096
3	64	256	64	128	256	1024	512	1024
4	32	128	32	128	256	1024	1024	4096
5	128	512	512	1024	1024	4096	4096	16384
6	128	256	128	512	128	256	1024	4096
7	128	512	128	256	512	1024	1024	2048
8	128	256	128	512	1024	2048	2048	8192
9	128	512	32	128	256	1024	1024	2048
10	64	256	256	1024	512	1024	4096	8192
11	64	256	256	512	512	2048	2048	8192
12	64	256	32	128	64	256	2048	8192
13	128	512	256	512	256	1024	4096	16384
14	128	512	256	512	256	1024	4096	16384
15	256	512	256	1024	256	1024	2048	4096
16	256	512	128	512	256	512	1024	2048
17	128	256	128	256	256	512	1024	4096
18	256	512	256	1024	256	512	4096	8192
19	64	256	64	128	256	512	512	1024
20	128	512	256	512	128	512	1024	2048

Tab. 6

IV./3. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Bromelintest (Bromelin-c)

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	A HPSST m. 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		B Bromelintest m. 2 % Ery-Suspension nicht geschaukelt 15'/20° C		C Bromelintest m. 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		D Bromelintest m. Ery-Sediment geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	128	512	32	128	128	256	256	512
2	128	512	32	64	256	1024	1024	4096
3	128	512	16	64	256	512	1024	2048
4	128	512	64	128	256	512	512	2048
5	64	256	16	64	64	128	256	1024
6	32	128	32	64	64	256	256	1024
7	128	512	16	64	256	512	1024	4096
8	256	512	64	128	256	1024	1024	4096
9	256	1024	32	64	256	512	1024	2048
10	64	256	4	16	128	512	1024	4096
11	128	512	16	64	256	1024	256	1024
12	256	512	8	32	128	512	512	2048
13	128	512	8	32	256	512	2048	8192
14	64	128	8	32	64	256	256	512
15	64	128	16	64	64	256	128	512
16	64	256	8	32	512	1024	512	2048
17	128	256	32	64	64	256	512	2048
18	64	128	16	64	128	512	256	1024
19	64	256	16	64	256	1024	256	512
20	32	128	16	64	128	512	256	1024

Tab. 7

IV./4. Erreichte Titerhöhen mit dem HPSST und dem Bromelintest (Bromelin-d)

Anti-D-Serum gegen D-Erythrozyten

Versuch Nr.	A HPSST m. 2 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		B Bromelintest m. 10 % Ery-Suspension nicht geschaukelt 15'/20° C		C Bromelintest m. 10 % Ery-Suspension geschaukelt 30'/37° C		D Bromelintest m. Ery-Sediment geschaukelt 30'/37° C	
	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.	makr.	mikr.
1	64	512	32	128	128	512	256	512
2	64	256	32	128	64	256	128	1024
3	64	512	32	128	128	256	512	1024
4	128	512	16	64	64	256	1024	2048
5	128	1024	64	128	64	256	2048	16384
6	128	512	64	256	128	256	1024	2048
7	256	512	64	256	256	512	2048	8192
8	128	512	128	256	128	512	1024	8192
9	64	512	128	512	512	1024	512	2048
10	64	512	128	512	512	2048	1024	4096
11	128	512	128	512	512	2048	4096	16384
12	256	1024	64	512	128	512	2048	16384
13	128	512	64	512	128	512	512	1024
14	64	256	64	512	128	512	4096	16384
15	256	1024	64	256	256	512	2048	16384
16	128	512	64	256	128	512	1024	4096
17	256	1024	128	512	256	1024	512	2048
18	128	1024	128	256	256	1024	1024	4096
19	256	1024	128	512	256	1024	2048	8192
20	128	256	64	512	256	1024	2048	4096

Tab. 8

Übersicht über die durchschnittlich erreichten Titerwerte (angegeben in Titerstufen)

	A (HPSST) m. Ery-Susp. geschaukelt 30'/37° C		B m. Ery-Susp. nicht geschaukelt 15'/20° C		E m. Ery-Susp. geschaukelt 30'/37° C		C m. Ery-Susp. geschaukelt 30'/37° C		D m. Ery-Sedim. geschaukelt 30'/37° C	
	makrosk.	mikrosk.	makrosk.	mikrosk.	makrosk.	mikrosk.	makrosk.	mikrosk.	makrosk.	mikrosk.
Papaintest (B:30'/37°C)	6-7	8-9	6	8	-	-	8	1o	8-9	1o-11
Ficintest	6	8	-	-	7-8	9-1o	5	7	6	7-8
Bromelintest (Brom.-a)	6-7	8-9	7	8-9	-	-	9	1o-11	11-12	13
Bromelintest (Brom.-b)	6-7	8-9	7	8-9	-	-	8	9-1o	1o-11	12
Bromelintest (Brom.-c)	6-7	8-9	4	6	-	-	7-8	9	9	1o-11
Bromelintest (Brom.-d)	7	9	6	8	-	-	8	9	1o	12
HPSST	6-7	8-9	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 9

V. Untersuchungsergebnisse von 300 Kreuzproben mit Papain, Ficin und Bromelin (im Vergleich zu Coombstest und HPSST)

1. 100 Kreuzproben mit Papain

	Negativ	(negativ) "schwach" aggl.	zweifelhaft positiv "mittel-stark" aggl.	"stark" aggl.	positiv
	makr./mikr.	mikr.	mikr.	mikr.	makr./mikr.
Papain-test	52	41	7	2	-
Coombs-test	99	-	-	-	- 1
HPSST	99	-	-	-	- 1

2. 100 Kreuzproben mit Ficin

	negativ	(negativ) "schwach" aggl.	zweifelhaft positiv "mittel-stark" aggl.	"stark" aggl.	positiv
	makr./mikr.	mikr.	mikr.	mikr.	makr./mikr.
Ficin-test	70	23	5	2	-
Coombs-test	100	-	-	-	-
HPSST	100	-	-	-	-

3. 100 Kreuzproben mit Bromelin

	negativ	(negativ) "schwach" aggl.	zweifelhaft positiv "mittel-stark" aggl.	"stark" aggl.	positiv
	makr./mikr.	mikr.	mikr.	mikr.	makr./mikr.
Brome-lintest	57	31	9	3	-
Coombs-test	98	-	-	-	- 2
HPSST	99	-	-	-	- 1

Tab. 1o

Übersicht über die unspezifisch-positiven Reaktionsausfälle beim EST
(Versuchsreihe II - IV)

je 2o Kreuz-serien	B m.Ery-Susp.nicht geschaukelt 15'/20° C			E m.Ery-Susp. geschaukelt 30'/37° C			C m. Ery-Susp. geschaukelt 30'/37° C			D m. Ery-Sedim. geschaukelt 30'/37° C		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Papaintest (B:30'/37° C)	14	-	-				2o	7	1	19	9	3
Ficintest				21	5	2	3o	12	2	39	17	3
Bromelintest (Brom.-a)	15	-	-				32	9	4	3	11	8
Bromelintest (Brom.-b)	17	-	-				35	11	4	12	15	13
Bromelintest (Brom.-c)	1o	2	-				18	1o	-	2o	12	4
Bromelintest (Brom.-d)	41	8	-				27	19	3	13	16	13

\+ = mikrosk. "schwache" Aggl.
++ = mikrosk. "mittelstarke" Aggl.
+++ = mikrosk. "starke" Aggl.

Erläuterungen zu den Tabellen 11 - 17

In graphischen Darstellungen sollen die mikroskopisch festgestellten Titerunterschiede zwischen der Anwendung des HPSST und den im einzelnen angegebenen Methoden veranschaulicht werden.

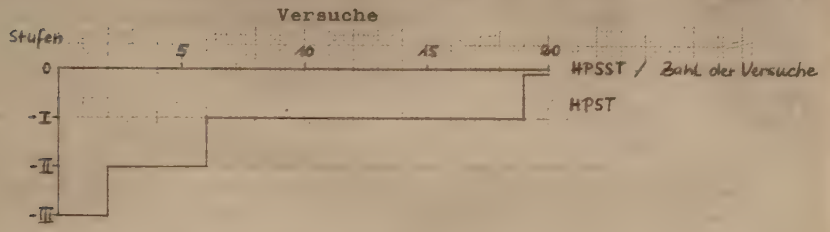
Die Abszisse entspricht jeweils dem HPSST und stellt damit die Bezugsachse für den Vergleich mit den verschiedenen Verfahren dar. Die Einteilung dieser Strecke entspricht der Zahl der vorgenommenen Versuche.

Auf der Ordinate sind im positiven Bereich die den HPSST übertreffenden, im negativen Bereich die zum HPSST niedriger liegenden Titer als Stufen eingezeichnet.

Daraus können die Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Methoden abgelesen werden.

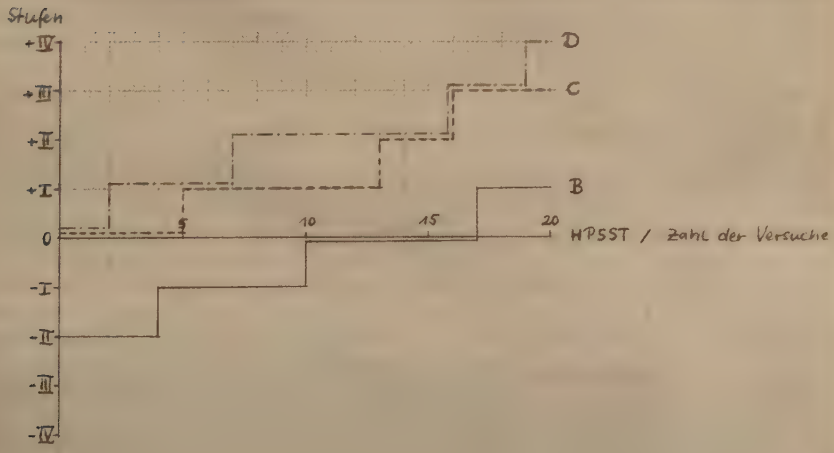
Tab. 11

I. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse des HPST gegenüber den Ergebnissen des HPSST



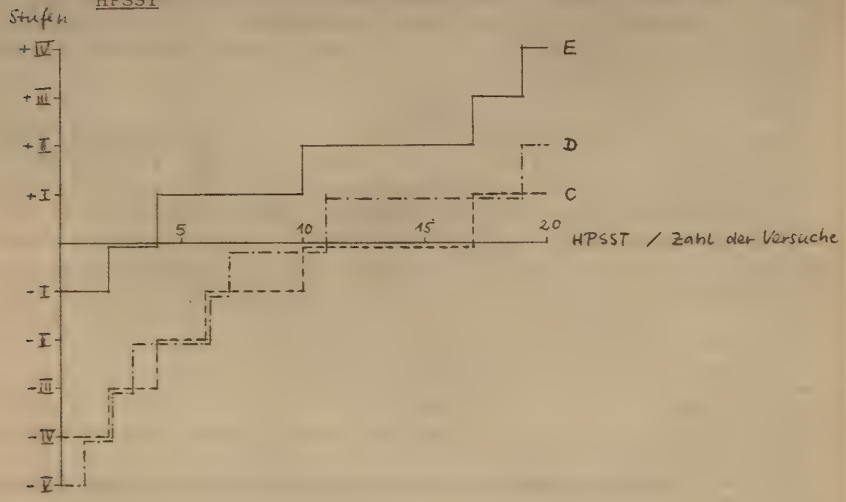
Tab. 12

II. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Papainmethoden B, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST



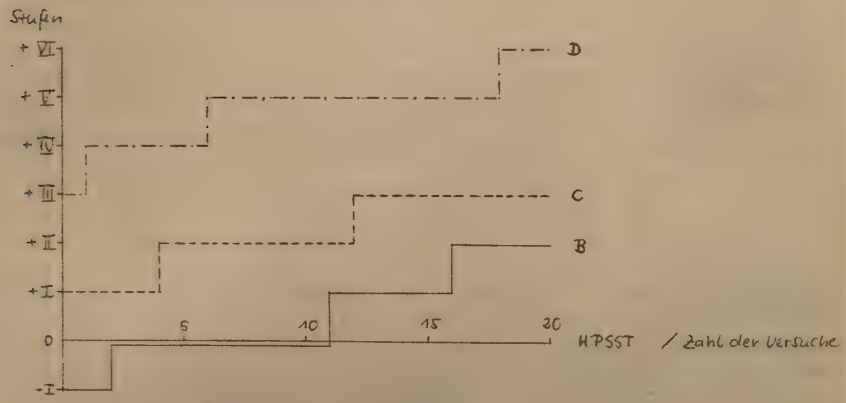
Tab. 13

III. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Ficinmethoden E, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST



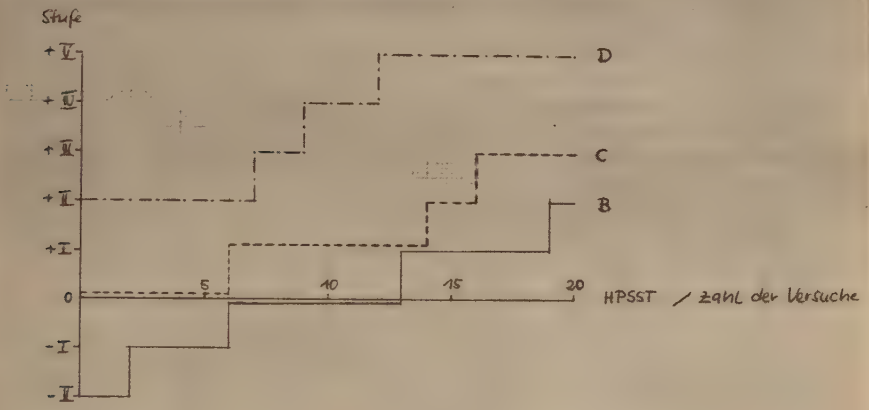
Tab. 14

IV/1. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Bromelin-Methoden B, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST (Bromelin-a)



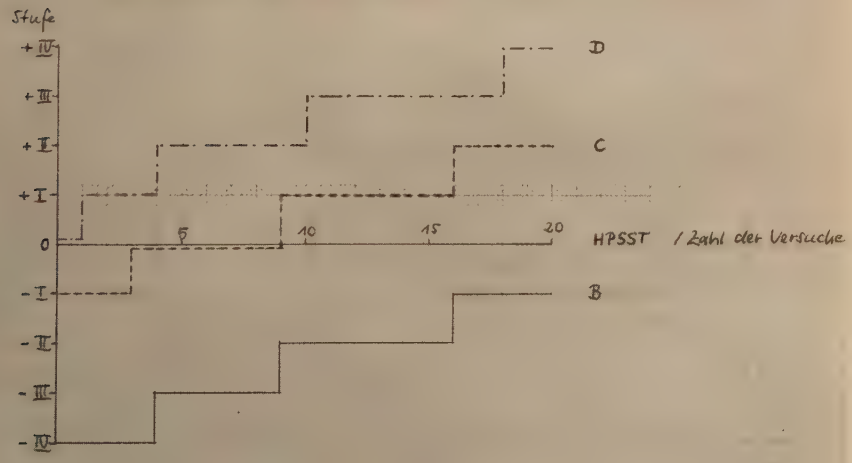
Tab. 15

IV/2. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Bromelinmethoden (Bromelin-b) B, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST



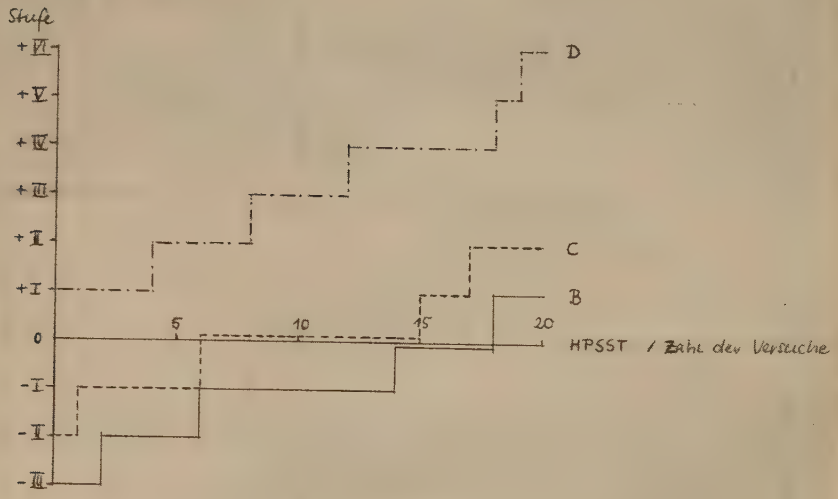
Tab. 16

IV/3. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Bromelinmethoden (Bromelin-c) B, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST



Tab. 17

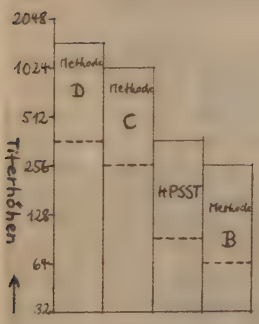
IV/4. Mikroskopische Titerunterschiede der Ergebnisse der Bromelinmethoden (Bromelin-d) B, C und D gegenüber den Ergebnissen des HPSST



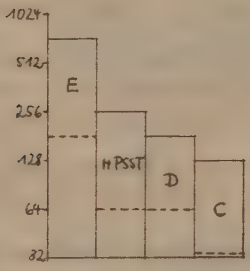
Durchschnittlich erreichte Titerhöhen mit dem HPSST, dem Papain-, Ficin- und Bromelintest.

——— = mikroskopisch
----- = makroskopisch

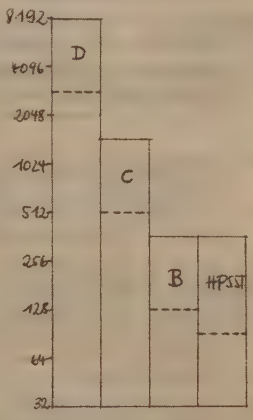
Tab. 18
Papaintest



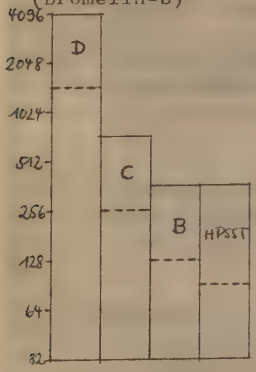
Tab. 19
Ficintest



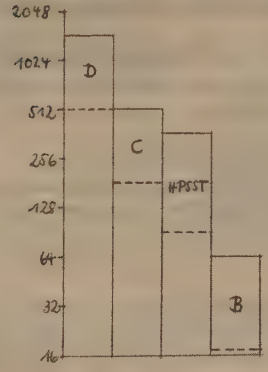
Tab. 20
Bromelintest
(Bromelin-a)



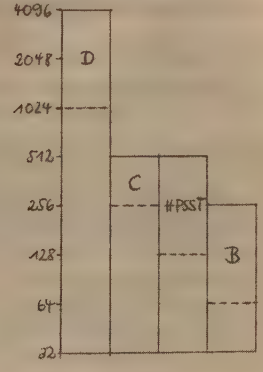
Tab. 21
Bromelintest
(Bromelin-b)



Tab. 22
Bromelintest
(Bromelin-c)



Tab. 23
Bromelintest
(Bromelin-d)



Literaturverzeichnis

1. Brühl, P. und U. Steinmetz

Erfahrungen beim Nachweis von Erythrozyten-Antikörpern mit dem Bromelintest, MMW 33 (1963), 1602

2. Burnet, F. M.

Initiation of cellular infection by influenza and related viruses, Lancet I (1948), 7

3. Cawley, L. P., L. Eberhardt and W. L. Goodwin

Agar-gel electrophoretic and analytic agar-gel electrophoretic study of bromelin, Transfusion (Philad.) 4 (1964), 441

4. Cawley, L. P., D. Schneider and L. Eberhardt

Immunoelectrophoretic and serologic study of the immunologically active components of bromelin with rabbit anti-bromelin, Vox Sang. 11 (1966), 81

5. Chittenden, R. H.

On the proteolytic action of bromelin, the ferment of pineapple juice, J. Physiol. 15 (1894), 249

6. Claflin, A.

An evaluation of the bromelin method by means of comparison with the indirect Coombs-test in detection of erythrocyte antibodies, Amer. J. Clin. Path. 35 (1961), 420

7. Coombs, R. R. A., A. E. Mourant and R. R. Race

A new test for the detection of weak and "inclomete" Rh-agglutinins, Brit. J. Exper. Path. 26 (1945), 255

8. Cornils, P.

Quantitative Leistungssteigerung des Hoch-Protein-Slide-Testes durch Bewegung der Reaktionsgemische während der Inkubationszeit, Diss. Tübingen 1967

9. Deutsche Gesellschaft für Bluttransfusion

Das Bluttransfusionswesen, Friedr.-Karl Schattauer-Verl., Stuttgart 1963

10. Diamond, L. K. and R. L. Denton

Rh agglutination in various media with particular reference to the value of albumin, J. Laborat. Clin. Med. 30 (1945), 821

11. Esche, v. d., P.

Über den Nachweis irregulärer Antikörper in Blutkonserven, Arch. Hyg. (Berlin) 143 (1959), 383

12. Friedenreich, V.

Untersuchungen über das von O. Thomsen beschriebene vermehrungsfähige Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen, Zschr. Immunit. forsch. 55, 1/2, (1928), 84

13. Giles, C. M.

Survey of uses for ficin in blood group serology, Vox Sang. 5 (1960), 467

14. Goldsmith, K. and M. B. Lond

Papain-treated cells in the detection of incomplete antibodies, Lancet I (1955), 76

15. Haber, G. and R. E. Rosenfield

Ficin treated red cells for hemagglutination studies, P. H. Andresen Festkrift, Munksgaard, Copenhagen (1957) 45 - 50

16. Hekker, A. C., W. Momp-Magnee, H. W. Krijnen and J.J. van Loghem

A papain slide test for Rh mass typing, Vox. Sang. 2 (1957), 128

17. Horvath, E., B. Rex-Kiss und J. Simon

Erfahrungen mit dem Papain-Objektträger-Test nach Hekker, Folia Haemat. (Leipzig) 85 (1966), 357

18. Hummel, K. E. Leopold und R. Hein

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Ferment-Konglutinationsteste zum Nachweis inkompletter Hämagglutinine, Zschr. Immunit. forsch. 130 (1966), 398

19. Kramer, D. E. and J. R. Whitaker

Ficus Enzymes. II Properties of the proteolytic enzymes from the latex of ficus carica variety Kadota, J. Biol. Chem. 239 (1964), 2178

20. Kuhns, W. J. and A. Bailey

Use of red cells modified by papain for detection of the Rh antibodies, Amer. J. Clin. Path. 20 (1950), 1067

21. Landsteiner, K. and A. S. Wiener

An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.) 43 (1940), 223

22. Lewis, A. J.

Papain, ficin and bromelin in the detection of incomplete rhesus antibodies, Brit. J. Haemat. 3 (1957), 332

23. Löw, B.

A practical method using papain and incomplete Rh - antibodies in routine Rh blood-grouping, Vox. Sang. 5 (1955), 94

24. Májsky, A.

Zur Verwendung von Bromelin in der Immunhaematologie, Zschr. inn. Med. (Leipzig) 19 (1964), 410

25. Májsky, A. und V. Kulhánek

Prozonen-Phänomen beim Bromelintest nach Pirofsky, Zschr. Immunit. Allerg. forsch. (Stuttgart) 127 (1964), 18

26. Makinodan, T. and N. T. Macris

The effect of ficin on the agglutination of human red blood cells, J. Immunol. 75 (1955), 192

27. Morton, J. A. and M. M. Pickles

Use of trypsin in the detection of incomplete anti-Rh-antibodies, Nature 159 (1947), 779

28. Mosler, W.

Über die Brauchbarkeit des Papaintestes zum Nachweis inkompletter Rh-Antikörper, Dtsch. Ges. Wes. 16 (1955), 569

29. Murachi, T., M. Yasui and Y. Yasuda

Purification and physical characterization of stem bromelain, Biochemistry 3 (1964), 48

30. Pickles, M. M.

Effect of cholera filtrade on red cells as demonstrated by incomplete Rh antibodies, Nature 158 (1946), 880

31. Pirofsky, B.

The use of bromelin in establishing a standart cross-match, Amer. J. Clin. Path. 32 (1959), 350

32. Pirofsky, B.

The influence of a plasma factor on the erythrocyte antibody-antigen-bromelin-reaction, Vox Sang. 5 (1960), 442

33. Pirofsky, B. and M. S. Cordova

The nature of incomplete antibodies, Vox Sang. 9 (1964), 17

34. Pirofsky, B. and M. E. Mangum

Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 101 (1959), 49

35. Prokop, O. und G. Uhlenbruck

Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen, 2. Aufl. Leipzig 1963

36. Püschel, J.

Zur Frage der Verwendung enzymbehandelter Erythrozyten in der Blutgruppenserologie mit experimentellen Untersuchungen über die Artantikörper in M/N-Antiseren von Kaninchen, Zschr. Hyg. 137 (1953), 67

37. Schneider, W.

Möglichkeiten und Grenzen des Hochprotein-Slide-Testes, z. Z. im Druck

38. Seaman, G. V. F. and G. Uhlenbruck

The action of proteolytic enzymes on the red cells of some animal species, Biochim. Biophys. Acta 64 (1962), 570

39. Seaman, G. V. F. und G. Uhlenbruck

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Erythrozyten nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen und Antiseren, Klin. Wschr. 40 (1962), 699

40. Sgarbierei, V. C., S. M. Gupte, D. E. Kramer and J. R. Whitaker

Ficus Enzymes. I Separation of the proteolytic enzymes of ficus carica and ficus glabrata latices, J. Biol. Chem. 239 (1964), 2170

41. Speiser, P. E. Rigl und R. Neuhold

Über den Wert des Papaintestes in der Serologie der Blutfaktoren, Zschr. Immunit. forsch. 110 (1953), 93

42. Spielmann, W.

Über die Verwendung von Immunseren und papainbehandelten Erythrozyten zum Nachweis schwacher A-Rezeptoren, Klin.Wschr. 31, 13/14 (1953), 337

43. Spielmann, W.

Über die Natur des unvollständigen Antikörpers und seine immunbiologische und klinische Bedeutung, Erg. Hyg. 28 (1954), 203

44. Stratton, F.

A slide test for the detection of Rh-antibodies using papain treated cells, Vox Sang. 3 (1953), 43

45. Szilard, L.

The control of the formation of specific proteins in bacteria and in animal cells. The molecular basis of antibody formation, Proc. Nat. Acad. Sci. 46 (1960), 277, 293

46. Uhlenbruck, G. und Z. Kim

Abhängigkeit serologischer Reaktionen von der Oberflächenstruktur der Erythrozyten, "Biotest"-Mitt. H. 23 (1966), 33

47. Vetter, O. und J. Schäffner

Die Anwendung von Bromelin bei der serologischen Kreuzprobe im Mikrotest, Dtsch. Ges. wes. 42 (1961), 1986

48. Vetter, O. und J. Schäffner

Gewinnung einer Pflanzenprotease (Bromelin) und ihre Anwendung beim Nachweis von Blutfaktoren und Erythrozyten-Antikörpern, Blut VII (1961), 335

49. Wheeler, E., A. L. Luhby and M. L. Scholl

The action of enzymes in hemagglutinating systems. II Agglutinating properties of trypsin-modified red cells with anti-Rh-sera, J. Immunol. 65 (1950), 39

50. Wiener, A. S.

A new test (Blocking Test) for Rh sensitization, Proc. Soc. Exper. Biol. (N. Y.) 56 (1944), 173

51. Wiener, A. S. and L. Katz

Studies on the use of enzyme-treated red cells in tests for Rh sensitization, J. Immunol. 66 (1951), 51

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dozent Dr. W. Schneider herzlich für die Überlassung dieser Arbeit sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung bei ihrer Anfertigung danken.

Lebenslauf

Am 30. September 1942 wurde ich, Barbara Renate Stiefel, als erstes Kind des Professor Dr. phil. Eberhard Stiefel und seiner Ehefrau Theodora, geb. Bazlen, in Schwäbisch Hall geboren.

Vom Herbst 1949 bis Frühjahr 1953 besuchte ich die Grundschule in Schwäbisch Gmünd und Eßlingen (Neckar), im Anschluß daran das Mädchengymnasium in Eßlingen. Dort bestand ich am 5. März 1962 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1962/63 nahm ich das Studium der Medizin an der Universität Graz auf. Im Sommersemester 1963 wechselte ich für zwei Semester an die Universität Hamburg, wo ich am 24. April 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1964 setzte ich das Studium an der Universität Tübingen fort. Die ärztliche Vorprüfung legte ich am 22. Juli 1966 ab.

Am 31. Juli 1970 bestand ich das medizinische Staatsexamen.